NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

8600-1
9
2-1

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. H. HERKEN
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

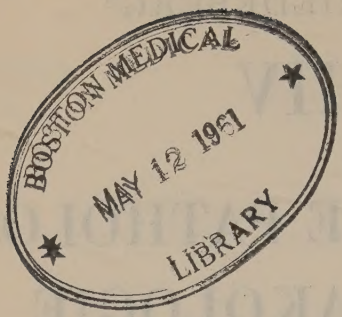
DR. P. HOLTZ
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

231. BAND

MIT 198 TEXTABBILDUNGEN UND 1 PORTRÄT

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1957



Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg
Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften

Inhaltsverzeichnis

Seite

Wolfgang Heubner zum Gedächtnis. Mit 1 Porträt 1

Andik, I., J. Bank und **Sz. Donhoffer,** Über die Wirkung von Hypothalamusläsionen auf die Nahrungsaufnahme und Nahrungswahl der Ratte. Mit 3 Textabbildungen 55

Balzer, H., s. **Holtz, P.** und **E. Westermann**

—, —, —, und **Eveline Wezler**

Bank, J., s. **Andik, I.** und **Sz. Donhoffer**

Bässler, K. H., und K. **Lang,** Zur Wirkung von Butazolidin auf Glutaminsäure-dehydrogenase und α-Ketoglutarat-oxydase 254

Bättig, K., und **E. Grandjean,** Der zeitliche Ablauf einer bedingten Fluchtreaktion bei der Ratte. Mit 7 Textabbildungen 119

Benkö, A., s. **Horváth, Eva** und **K. Kovács**

Benešová, O., O. Burešová und **J. Bureš,** Die Wirkung des Chlorpromazins und der Glykämie auf das elektrophysiologisch kontrollierte Überleben der Hirnrinde bei verschiedenen Körpertemperaturen. Mit 4 Textabbildungen 550

Bethe, K., W. D. Erdmann, L. Lendle und **G. Schmidt,** Spezifische Antidot-Behandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen. Mit 6 Textabbildungen 3

Bornmann, G., Die choleretische Wirkung eines Guajakol-Butandioläthers. Mit 2 Textabbildungen 262

Brandstetter, W., E. Kiesewetter und **F. X. Wohlzogen,** Beeinflussung experimentell-pathologischer Veränderungen bei Nagern durch Hyaluronsäure. Mit 1 Textabbildung 186

Brelie, E. von der, s. **Rummel, W., H. Jacobi** und **F. J. Kreutzer**

Brücke, F., S. Sailer und **Ch. Stumpf,** Pharmakologische Beeinflussung der Frequenz der Hippocampustätigkeit während retikulärer Reizung. Mit 3 Textabbildungen 267

Bureš J., s. **Benešová, O.,** und **Burešová, O.**

Burešová, O., s. **Benešová, O.,** und **J. Bureš**

Clodi, P. H., s. **Stormann, H., O. Kraupp** und **B. Pillat**

Cullmann, B., s. **Kuschinsky, G., P. Jungblut** und **H. Vorherr**

Dahm, F., s. **Eichler, O.,** und **F. Hertle**

Decsi, L., J. Méhes und **F. Varga,** Über die Veränderungen des Leberzellstoffwechsels bei CCl_4-Vergiftung 235

Dengler, H., Über das Vorkommen von Oxytyramin in der Nebenniere. Mit 2 Textabbildungen 373

Diamant, H., K. Graf und **B. Holmstedt,** Die Wirkung von Acetyl-β-Methylcholinjodid(MeCh) auf die Skeletmuskeldurchblutung des Menschen. Mit 4 Textabbildungen 78

Donhoffer, Sz., s. **Andik, J.,** und **J. Bank**

Dörner, J., und **C. R. Swaine,** Quantitative Untersuchungen zur Frage der Abhängigkeit der Stärke vasoconstrictorischer Wirkungen von der Größe der Ausgangsdurchblutung. Mit 9 Textabbildungen 526

Dutz, H., s. **Krautwald, A.,** und **K. Voigt**

Eichler, O., F. Hertle und **F. Dahm,** Weitere Untersuchungen über basische Phenoläther. Mit 1 Textabbildung 292

Seite

Engelhardt, G., und **G. Hahn,** Pharmakologische Beeinflussung anaphylaktischer Reaktionen an Gefäßpräparaten. Mit 6 Textabbildungen 507

Engelhorn, R., Aktionspotentiale der Nierennerven. Mit 5 Textabbildungen . 219

Erdmann, W. D., s. **Bethe, K., L. Lendle** und **G. Schmidt**

Földes, István., s. **Komlós, Endre**

Gangloff, H., und **M. Monnier,** Topische Wirkung des Phenobarbitals auf Cortex, Rhinencephalon, Nucleus caudatus, Thalamus und Substantia reticularis des Kaninchens. Mit 2 Textabbildungen 211

Gerstenberg, E, A. Hasselblatt und **G. Schmidt,** Wirkung hoher Dosen des oralen Antidiabeticum D 860 („Artosin", „Rastinon") auf neuromotorische Funktionen, besonders des Rückenmarkes. Mit 4 Textabbildungen 407

—, s. **Wagenmann, U., E. Schmid** und **R. Taugner**

Gossweiler, N., Die Schutzwirkung der Dinitrile gegen Vergiftungen mit Botulinus Toxin A 279

—, Über die Wirkung von Succinodinitril auf den mit Curare und Botulinustoxin A vergifteten Muskel. Mit 3 Textabbildungen 286

Graf, K., s. **Diamant, H.,** und **B. Holmstedt**

Grandjean, E., s. **Bättig, K.**

Greeff, K., Mineralstoffwechselwirkung und Toxicität des Strophanthins bei nebennierenlosen Ratten 391

Gruneberg, J., und **H. Langecker,** Der Abbau von α-Phenylpropylalkohol im Organismus von Kaninchen, Hund und Mensch 91

Hahn, F., und **A. Oberdorf,** Vergleichende Versuche mit β-Methyl-β-äthylglutarimid, Pentamethylentetrazol und Pikrotoxin am EEG und Blutdruck der Katze. Mit 3 Textabbildungen 298

Hahn, G., s. **Engelhardt, G.**

Hasselblatt, A., s. **Gerstenberg, E.,** und **G. Schmidt**

Hergott, J., s. **Ther, L.,** und **R. Muschaweck**

Hertle, F., s. **Eichler, O.,** und **F. Dahm**

Hertting, G., und **E. Stoklaska,** Zur Beeinflussung des Rattenpfotenödems durch die Narkose. Mit 2 Textabbildungen 562

Holmstedt, B., s. **Diamant, H.,** und **K. Graf**

Holtz, F., und **A. Tilgner-Peter,** Die Wirkung von Dihydrotachysterin (AT 10) auf Hühner. Mit 3 Textabbildungen 596

Holtz, P., H. Balzer und **E. Westermann,** Die Beeinflussung der Reserpinwirkung auf das Nebennierenmark durch Hemmung der Mono-aminoxydase. Mit 5 Textabbildungen 361

—, —, —, und **Eveline Wezler,** Beeinflussung der Evipannarkose durch Reserpin, Iproniacid und biogene Amine. Mit 1 Textabbildung 333

—, und **E. Westermann,** Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylase des Gehirns durch Brenzcatechinderivate. Mit 10 Textabbildungen 311

Horváth, Éva, K. Kovács und **A. Benkö,** Die Wirkung des Cortisons auf die Gewebespeicherung der Methylcellulose 401

Jacobi, H., s. **Rummel, W., F. J. Kreutzer** und **E. von der Brelie**

—, —, **Pfleger, K.,** und **H. Stupp**

Job, C., und **W. Schaumann,** Bronchokonstriktorische Fasern im Halsvagus des Meerschweinchens. Mit 2 Textabbildungen 388

Jungblut, P., s. **Kuschinsky, G., H. Vorherr** und **B. Cullmann**

Kalkoff, W., Quantitative Analyse der Blutdruckwirkung des Präparates „Megaphen (Bayer)". Mit 2 Textabbildungen 568

Seite

Kiese, M., und **G. Lange,** Calorimetrische Messung der Durchblutung des Herzmuskels. Mit 5 Textabbildungen 149

—, **K. Resag** und **Cl. Schneider,** Reduktion von Nitrosobenzol durch Hämiglobinreduktase und durch altes gelbes Ferment. Mit 4 Textabbildungen . 170

—, —, —, Reduktion von Hämiglobin durch altes gelbes Ferment. Mit 3 Textabbildungen 176

—, **Cl. Schneider** und **H.-D. Waller,** Hämiglobinreduktase. Mit 3 Textabbildungen 158

Kiesewetter, E., s. **Brandstetter, W.,** und **F. X. Wohlzogen**

Kolder, H. J., und **L. Stockinger,** Feinstrukturelle Veränderungen in der Lunge nach explosiver Dekompression und Kompression. Mit 9 Textabbildungen 23

Komlós, Endre, und **István Földes,** Die Wirkung von Histamin und 48/80 auf Gasstoffwechsel und die Körpertemperatur weißer Ratten. Mit 2 Textabbildungen 542

Kovács, K., s. **Horváth, Eva,** und **A. Benkö**

Kozák, J., s. **Zelený, A.,** und **V. Lindaur**

Kraatz, Hans Gunther, und **Wolfgang Trautwein,** Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die neuromuskuläre Erregungsübertragung. Mit 12 Textabbildungen 419

Kraupp, O., s. **Stormann, H., B. Pillat** und **P. H. Clodi**

Krautwald, A., H. Dutz und **K. Voigt,** Verlauf und histologische Veränderungen der experimentellen Nephritis bei Ratten unter Einwirkung von Sulfapyridin und Sulfadimethyl-pyrimidin. Mit 4 Textabbildungen . . . 455

—, —, —, Verlauf und histologische Nierenveränderungen bei der experimentellen Nephritis unter Einwirkung von Penicillin, Terramycin und Streptomycin. Mit 4 Textabbildungen 464

Kreutzer, F. J., s. **Rummel, W., H. Jacobi** und **E. von der Brelie**

Kroneberg, G., und **H. J. Schümann,** Die Wirkung des Reserpins auf den Hormongehalt des Nebennierenmarks. Mit 1 Textabbildung 349

Kukovetz, W., Die Leistungsreserve des hypothermen Herzmuskels am Herz-Lungen-Präparat der Ratte. Mit 4 Textabbildungen 496

Kuschinsky, G., P. Jungblut, H. Vorherr und **B. Cullmann,** Die Wirkung von Thiopental-Natrium und Pentobarbital-Natrium auf die Nierengefäße von Mäusen. Mit 4 Textabbildungen 473

—, **H. Vorherr** und **U. Trendelenburg,** Über den Einfluß der Hormone des Nebennierenmarks auf die Blutverteilung in Mäusenieren. Mit 3 Textabbildungen 479

Lang, K., s. **Bässler, K. H.**

Lange, G., s. **Kiese, M.**

Langecker, H., s. **Gruneberg, J.**

Lendle, L., s. **Bethe, K., W. D. Erdmann** und **G. Schmidt**

Lindaur, V., s. **Zelený, A.,** und **J. Kozák**

Lundsgaard-Hansen, P., Vergleich der Wirkungen von Calcium und Digitalis auf die aktiven und passiven Kaliumbewegungen durch die Erythrocytenmembran. Mit 3 Textabbildungen 577

Maske, Helmut, s. **Weinges, Kurt**

Matthies, H., Die Wirkung von Phenylalkylaminen auf die Sensibilität von acetylcholinempfindlichen Receptoren peripherer Gefäßgebiete. Mit 4 Textabbildungen 133

Méhes, J., s. **Decsi, L.,** und **F. Varga**

Monnier, M., s. **Gangloff, H.**

Seite

Muschaweck, R., s. **Ther, L.,** und **J. Hergott**

Oberdorf, A., s. **Hahn, F.**

Ohnesorge, G., s. **Zetler, G.**

Pfleger, K., s. **Rummel, W., H. Jacobi** und **H. Stupp**

Pillat, B., s. **Stormann, H., O. Kraupp** und **P. H. Clodi**

Reichertz, P., s. **Zipf, H. F.**

Resag, K., s. **Kiese, M.,** und **Cl. Schneider** (s. 170 u. 176)

Rummel, W., H. Jacobi, F. J. Kreutzer und **E. von der Brelie,** Abhängigkeit der N_2O-Narkoseschwelle von Erregungszustand und Stoffwechsel. Mit 4 Textabbildungen 141

—, —, **K. Pfleger** und **H. Stupp,** Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels am isolierten Darm. Mit 4 Textabbildungen 246

Sailer, S., und **Ch. Stumpf,** Beeinflußbarkeit der rhinencephalen Tätigkeit des Kaninchens. Mit 7 Textabbildungen 63

—, s. **Brücke, F.,** und **Ch. Stumpf**

Schaumann, W., Resistenz einiger Wirkungen peripherer Vagusreizung gegenüber Ganglienblockern. Mit 4 Textabbildungen 378

—, s. **Job, C.**

Schmidt, G., s. **Bethe, K., W. D. Erdmann** und **G. Schmidt**

—, s. **Gerstenberg, E.,** und **A. Hasselblatt**

Schmid, E., s. **Wagenmann, U., E. Gerstenberg** und **R. Taugner**

Schneider, Cl., und **H.-H. Wagner,** Fehlen des Hämiglobinreduktase-Systems im Erythrocyten des Schweines. Mit 3 Textabbildungen 179

—, s. **Kiese, M.,** und **K. Resag** (s. 170 u. 176)

—, —, und **H.-D. Waller**

Schümann, H. J., s. **Kroneberg, G.**

Stockinger, L., s. **Kolder, H. J.**

Stoklaska, E., s. **Hertting, G.**

Stormann, H., O. Kraupp, B. Pillat und **P. H. Clodi,** Die Verstärkung der Acetylcholinwirkung auf die quergestreifte Skeletmuskulatur durch Austausch des extracellulären Natriumchlorids gegen Natriumsulfat, Natriumnitrat, Natriumbromid und Saccharose. Mit 4 Textabbildungen. 488

Stumpf, Ch., s. **Sailer, S.**

—, s. **Brücke, F.,** und **S. Sailer**

Stupp, H., s. **Rummel, W., H. Jacobi** und **K. Pfleger**

Swaine, C. R., s. **Dörner, J.**

Taugner, R., s. **Wagenmann, U., E. Gerstenberg** und **E. Schmid**

Ther, L., R. Muschaweck und **J. Hergott,** Antagonismus zwischen Adenosin und Methyl-Xanthine am Reizleitungssystem des Herzens. Mit 1 Textabbildung 586

Tilgner-Peter, A., s. **Holtz, F.**

Trautwein, Wolfgang, s. **Kraatz, Hans Günther**

Trendelenburg, U., s. **Kuschinsky, G.,** und **H. Vorherr**

Varga, F., s. **Decsi, L.,** und **J. Méhes**

Vlk, Jaroslaw, Über den Einfluß von Chlorpromazin auf den Acetylcholingehalt des Herzens. 591

Voigt, K., s. **Krautwald, A.,** und **H. Dutz**

Vorherr, H., s. **Kuschinsky, G.,** und **U. Trendelenburg**

—, —, **Jungblut, P.,** und **B. Cullmann**

Seite

Wagenmann, U., E. Gerstenberg, E. Schmid und **R. Taugner,** Kreislaufreaktionen beim „Tiefen Atemzug". Mit 3 Textabbildungen 111

Wagner, H.-H., s. **Schneider, Cl.**

Waller, H.-D., s. **Kiese, M.,** und **Cl. Schneider**

Weinges, Kurt, und **Helmut Maske,** Pankreatektomie und Cortisonwirkung bei Mereschweinchen. Mit 1 Textabbildung 440

Westermann, E., s. **Holtz, P.**

—, —, **H. Balzer** und **Eveline Wezler**

—, —, und **H. Balzer**

Wezler, Eveline, s. **Holtz, P., Balzer, H.,** und **E. Westermann**

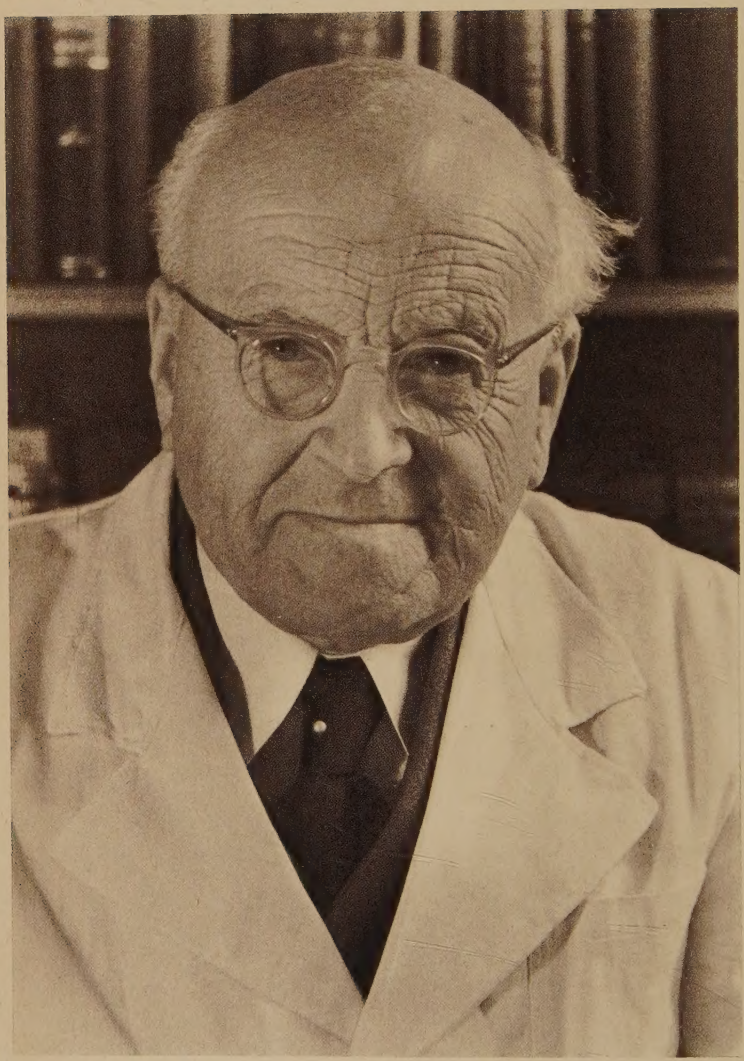
Wohlzogen, F. X., s. **W. Brandstetter** und **E. Kiesewetter**

Zelený, A., V. Lindaur und **J. Kozák,** Der Acetylcholingehalt des Gehirns nach Verabreichung von Chloropromazin 593

Zetler, G., Der Harmin-Tremor und seine Antagonisten. Mit 4 Textabbildungen 34

—, und **G. Ohnesorge,** Die Substanz P-Konzentration im Gehirn bei verschiedenen Funktionszuständen des Zentralnervensystems. Mit 3 Textabbildungen 199

Zipf, H. F., und **P. Reichertz,** Darstellung der totalen und reversiblen Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren durch Wirkung/Zeit-Kurven. Mit 5 Textabbildungen 96



Heubner

Arch. exper. Path. u. Pharmakol.
Bd. 231 (1957)

Springer-Verlag
Berlin · Göttingen · Heidelberg

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 1—2 (1957)

Wolfgang Heubner
zum Gedächtnis

Am 26. Februar 1957, wenige Monate vor der Vollendung seines 80. Lebensjahres, starb — nach kurzer Krankheit — in Heidelberg, wo er seit seiner Emeritierung (1953) lebte, der frühere Berliner Ordinarius, der Nestor der Deutschen Pharmakologie, unser ältestes Redaktionsmitglied.

Wolfgang Heubner hatte nach dem Tode Walter Straubs die redaktionelle Leitung des Archivs übernommen, als dieses 1947 nach 2½jähriger Unterbrechung durch den Krieg wieder erscheinen konnte.

Mit hohem Verantwortungsgefühl hat er während einer 10jährigen redaktionellen Tätigkeit das von seinem Lehrer Oswald Schmiedeberg, dem Mitbegründer des Faches und des Archivs übernommene Erbe verwaltet, und bis in die letzten Tage seines Lebens widmete er seine unermüdliche Arbeitskraft auch der Redaktion des Archivs. Der internationalen Geltung seines Namens, die er sich durch sein umfassendes Wissen auf allen Gebieten der Medizin, durch grundlegende eigene Arbeiten und ein unbestechliches Urteil erworben hatte, ist es wesentlich zu danken, daß unser Archiv sich auch im Ausland zunehmenden Ansehens erfreut. In seltenem Maße besaß er die Eigenschaften, die für den Schriftleiter einer wissenschaftlichen Zeitschrift wesentlich sind: kritische Urteilsfähigkeit und Verantwortungsbewußtsein. Durch sein feines Gefühl für die sprachliche Reinheit des Ausdrucks hat er in hohem Maße erzieherisch auf die Mitarbeiter des Archivs eingewirkt.

Unermüdlich war sein Bestreben, die Autoren zur selbstkritischen, knappen und sprachlich sauberen Abfassung ihrer Arbeiten zu verpflichten. Schriftleitung und Verlag fühlen sich Wolfgang Heubner in Verehrung und Dankbarkeit verpflichtet.

Sein wissenschaftliches Werk und seine Persönlichkeit werden auf der Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Freiburg/Br. (Juni 1957) durch den derzeitigen Vorsitzenden der Gesellschaft, Professor P. Holtz, eine Würdigung erfahren, die im Tagungsbericht zum Abdruck gelangt.

Der Verlag Die Schriftleitung

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 3—22 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. Lendle)

Spezifische Antidot-Behandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen*

Von
K. Bethe, W. D. Erdmann, L. Lendle und G. Schmidt

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. März 1957)

Mit intravenösen Dauerinfusionen von Alkylphosphaten lassen sich an betäubten Meerschweinchen protrahierte Vergiftungen erzeugen, in deren Verlauf der therapeutische Effekt einer Gegenbehandlung an der Besserung von Puls- und Atemfrequenz sowie an der Verschiebung der Letaldosis zu höheren Werten hin abgelesen werden kann. Erdmann u. Lendle (1957) haben mit diesem Verfahren gezeigt, daß die Toxicität von Alkylphosphaten durch künstliche Beatmung auf $^1/_6$, durch Atropin aber nur auf $^1/_2$—$^1/_5$ abgeschwächt wird. Dieser Befund unterstreicht den Wert einer schon von Holmstedt (1951) geforderten künstlichen Beatmung bei Alkylphosphat-Vergiftungen, während die mit Atropin (trotz sehr hoher Dosen) erzielten Ergebnisse eigentlich auch dann enttäuschen, wenn man berücksichtigt, daß es sich hierbei ja um eine lediglich symptomatische Therapie handelt.

Die Alkylphosphate sind fast durchweg hochwirksame Hemmstoffe für die Cholinesterase. Das Bild einer Alkylphosphat-Vergiftung entspricht daher weitgehend dem einer „endogenen Acetylcholinvergiftung" mit muscarinartigen und nicotinartigen Vergiftungssymptomen. Durch Atropin (in hohen Dosen) werden bekanntlich die cholinerg innervierten Erfolgsorgane vor dem freigewordenen Acetylcholin geschützt. Es werden also eine Reihe von — oft lebensbedrohlichen — Vergiftungs*symptomen* beseitigt. Die Ursache der Vergiftung, die Enzymblockade, bleibt jedoch bestehen, zumal die spontane Reaktivierung der blockierten Cholinesterase ein sehr langsam verlaufender Prozeß ist (Wirth 1954).

Neuerdings sind von Nachmansohn, Wilson u. ihren Mitarb. (Übersicht bei Nachmansohn 1955) die Möglichkeiten einer *kausalen* Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten, nämlich die Möglichkeiten einer Reaktivierung der blockierten Cholinesterase eingehend geprüft worden. Es wurde eine Reihe von Substanzen gefunden, die auf Grund bestimmter chemischer und physikalischer Eigenschaften (Löslichkeit,

* Herrn Professor Dr. K. Junkmann, Berlin, zum 60. Geburtstag.

Ladungscharakter, Affinität zu Phosphor usw.) geeignet sind, die durch Alkylphosphate blockierte (= phosphorylierte) Esterase zu reaktivieren. Am wirksamsten erwiesen sich hierbei das nicotinhydroxamsaure Methjodid (Wilson 1952, Wilson u. Meislich 1953 u. 1955, Roy u. Kuperman 1955) sowie neuerdings das 2-Pyridin-aldoxim-methjodid (Wilson u. Ginsburg 1955, Holmes u. Robins 1955, Loomis 1956, Kewitz u. Wilson, 1956).

Mit der von Erdmann u. Lendle (1957) verwendeten Methode der protrahierten Vergiftung mit Alkylphosphaten oder Eserin sollte jetzt — unter Kontrolle von Kreislauf und Atmung — der Wert einer spezifischen Antidotbehandlung mit dem nicotinhydroxamsauren Methjodid (NHMJ, sogenannten „Wilson-Körper") und Pyridin-aldoxim-methjodid (PAM) sowie mit dessen tertiären Analogen Pyridinaldoxim vergleichend geprüft werden. Es war hierbei auch zu ermitteln, ob und warum Atropin und künstliche Beatmung den therapeutischen Erfolg dieser Antidote zusätzlich verstärken.

Methodik

Methodisch folgten wir weitgehend der von Erdmann u. Lendle (1957) angegebenen Versuchsanordnung. Als Versuchstiere dienten wiederum mit Urethan (1,1 g/kg) betäubte und tracheotomierte Meerschweinchen.

1. Bei gleichbleibendem Infusionsvolumen (jeweils 10,0 cm^3/Std) wurden verschiedene Dosierungen (in mg/kg/Std) für die intravenöse Infusion des jeweilig verwendeten Alkylphosphates gewählt. Die fortlaufende Kontrolle von Elektrokardiogramm, Puls- und Atemfrequenz ermöglichte dabei, den Vergiftungsverlauf exakt zu verfolgen. In der Regel erfolgten intravenöse Antidot-Injektionen erst zu einem Zeitpunkt, wenn die Pulsfrequenz unter 100/min absank. So ließ sich der therapeutische Effekt der verschiedenen Antidote direkt ablesen und auch vergleichend prüfen. Zuverlässiger aber geben die unter der Antidotbehandlung erreichten letalen Titrationswerte (in mg/kg) an, welchen therapeutischen Wert die jeweils geprüfte Gegenbehandlung besitzt. Dieser Beurteilung wurden die von Erdmann u. Lendle (1957) ermittelten Toxicitätswerte (vgl. Tab. 1) zugrunde gelegt und — soweit möglich — auch statistisch gesichert:

Tabelle 1 (nach Erdmann u. Lendle)

	Letaldosen in mg/kg		
	ohne Behandlung	bei Atropinisierung	bei künstlicher Behandlung
Paraoxon	0,77 ± 0,26	ca. 1,0—3,0	nicht geprüft
Parathion	8,6 ± 1,6	nicht geprüft	ca. 52,0
Eserin	2,09 ± 0,69	16,54 ± 8,0	2,94 ± 1,14

2. In einer weiteren Versuchsreihe wurde auch die maximale Behandlungsleistung bei Vergiftungen mit Alkylphosphaten ermittelt, indem die Antidotgaben mit künstlicher Beatmung und Atropinisierung kombiniert wurden.

3. Um zu erkennen, welche Rolle dem Herzvagus bei der Vergiftung mit Alkylphosphaten zukommt, wurden schließlich noch Versuche an isolierten Herzen (Straub-Herz, Langendorff-Herz, Herz-Vorhof) sowie Infusionsversuche an

vagotomierten Meerschweinchen durchgeführt. Besondere methodische Bedingungen sind den jeweiligen Ergebnis-Abschnitten vorangestellt.

Folgende Substanzen wurden von uns verwendet:

1. Zur protrahierten Vergiftung. Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat (Paraoxon, E 600[1]). Der Wirkstoff wurde 10%ig in absolutem Alkohol gelöst und mit Ringer-Lösung zur gebrauchsfertigen Infusionslösung weiterverdünnt.

Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat (Parathion, E 605[1]). Der Wirkstoff wurde 1%ig in absolutem Alkohol gelöst und mit Adhägon[2] (0,5%)-Ringer-Lösung zur gebrauchsfertigen Infusionslösung weiterverdünnt.

Disiopropylfluorphosphat (DFP). Der Wirkstoff wurde 1%ig in absolutem Alkohol gelöst und mit Ringer-Lösung zur gebrauchsfertigen Infusionslösung weiterverdünnt.

Physostigminum sulfuricum (Eserin). Die Substanz wurde 1%ig in Aqua bidest. gelöst und mit Ringer-Lösung zur gebrauchsfertigen Infusionslösung weiterverdünnt.

2. Zur Gegenbehandlung. Nicotinhydroxamsaures Methjodid (NHJM, „Wilson-Körper", SR 1283[1]) als 1%ige Lösung.

2-Pyridin-aldoxim-methjodid (PAM, SR 1371[1]) als 1%ige Lösung.

Pyridin-aldoxim (SR 1367[1]), das tertiäre Analogon zu PAM, als 1%ige Lösung.

Atropinum sulfuricum als 0,1%ige Lösung.

Ergebnisse

I. Antidotwirkung am ganzen Tier

Als Beispiel für die experimentelle Prüfung der Antidotwirkung im Verlaufe einer protrahierten Vergiftung mit Alkylphosphat diene Abb. 1 (entspricht Versuch Nr. 1, Tab. 2). Bei der hier gewählten Dosierung von E 600 (Paraoxon, 0,25 mg/kg/Std i.v.) wäre das Tier ohne Gegenbehandlung nach etwa 3 Std zugrunde gegangen (Letaldosis nach Erdmann u. Lendle 0,77 $\pm$ 0,26 mg/kg). Nachdem SR 1283 (NHMJ, „Wilson-Körper", 60 mg/kg i.v.) keine sichtbare Besserung von Puls- und Atemfrequenz herbeizuführen vermocht hatte (vgl. Abb. 1, „I"), wurde SR 1371 (PAM, 60 mg/kg i.v.) injiziert. Es kam jetzt zu einer eindrucksvollen Normalisierung von Herzfrequenz und Atmung. 3½ Std später war (unter fortlaufender Infusion von E 600) erneut ein bedrohlicher Zustand des Tieres eingetreten. Abermals konnte durch SR 1371 (60 mg/kg i.v.) für weitere 3½ Std ein deutlicher Antidot-Effekt erzielt werden. Dann trat der Tod so plötzlich ein, daß irgendwelche lebensrettenden Maßnahmen zu spät kamen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren 2,46 mg/kg E 600 infundiert und damit die am unbehandelten Tier ermittelten Letaldosen (s. o.) bereits um mehr als das Dreifache überschritten worden.

---

[1] Für die Überlassung der Substanzen danken wir Herrn Professor Dr. med. et phil. W. Wirth-Elberfeld.

[2] Adhägon (Fa. Heyden) ist ein indifferentes Eiweißabbauprodukt und als Stabilisator für feindisperse Suspensionen geeignet.

In dieser hier gezeigten Weise sollten zunächst die für die Antidotbehandlung vorgesehenen drei SR-Präparate vergleichend bei Vergiftungen mit Paraoxon und Parathion geprüft werden. In parallelen Versuchen an mit Eserin vergifteten Tieren war dann die Spezifität dieser Gegenbehandlung zu kontrollieren.

1. Wirksamkeit und Spezifität der Gegenbehandlung. Um die therapeutische Wirksamkeit der geprüften Antidote (SR-Präparate) beurteilen zu können, wurden die 3 Substanzen entweder während einer Dauerinfusion mit Paraoxon in wechselnder Reihenfolge nacheinander injiziert

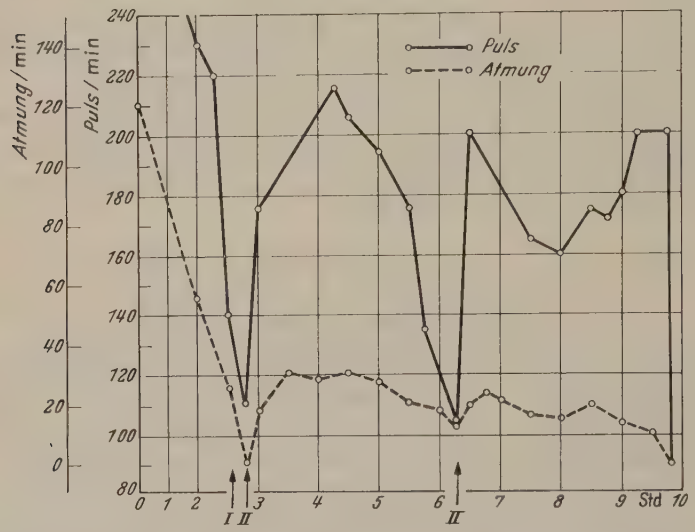


Abb. 1. Herz und Atemfrequenz eines mit Paraoxon vergifteten Meerschweinchens. Bei *I* i.v. Injektion von 60 mg/kg NHMJ, bei *II* i.v. Injektion von je 60 mg/kg PAM. PAM besitzt eine deutliche Antidotwirkung

(vgl. Tab. 2, Versuch Nr. 1—4) oder aber bei jeweils einer Titration mit Parathion für sich allein geprüft (vgl. Tab. 2, Versuch Nr. 6—9). Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Aus der Tabelle geht hervor, daß nur das quarternäre Oxim SR 1371 (PAM) als schnell wirksames, dabei aber auch langanhaltendes Antidot angesehen werden kann. SR 1283 (NHMJ, „Wilson-Körper") und das tertiäre Oxim SR 1367 sind nicht in der Lage, eine durch Alkylphosphate ausgelöste toxische Bradykardie und Atemdepression so nachhaltig zu beeinflussen.

Es entstand jetzt die Frage, ob die der symptomatischen Gegenbehandlung mit Atropin (vgl. Tab. 1) überlegene Antidot-Behandlung mit SR 1371 tatsächlich spezifischer Natur ist (s. S. 3 u. 4). Wenn dies der Fall ist, dann sollte man erwarten, daß SR 1371 bei einer

protrahierten Vergiftung mit Eserin (einem nicht zur Gruppe der Alkylphosphate gehörenden Hemmstoff der Cholinesterase) keine derartig eindrucksvolle curative Wirkung besitzt. Das Ergebnis dieser vergleichenden Versuche ist aus Tab. 3 ersichtlich.

Der Mittelwert der bei gleichzeitiger PAM-Behandlung gefundenen Letaldosen von Eserin beträgt 2,81 ± 0,5 mg/kg. Gegenüber der ohne Gegenbehandlung ermittelten Eserin-Letaldosis von 2,09 ± 0,69 mg/kg (Tab. 1) besteht keine hochsignifikante Differenz ($p < 0{,}05 > 0{,}01$;

Tabelle 2

Versuch Nr.	Infusionsgeschwindigkeit mg/kg/Std	Antidot		Frequenzänderung		Dauer der Besserung min	Letaldosis mg/kg
		Substanz i.v.	Dosis mg/kg	Herz	Atmung		
1	0,25	SR 1283	3×20	140—110	24— 0		
	E 600 i.v.	SR 1371	3×20	110—174	0—19	207	
		SR 1371	3×20	106—200	13—20	211	2,46
2	0,25	SR 1371	30	102—350	35—45	410	
	E 600 i.v.	SR 1367	30	95—120	36—52	35	
		SR 1283	30	94— 96	42—44	8	3,31
3	0,25	SR 1367	30	88— 76	30—33		
	E 600 i.v.	SR 1367	30	76— 74	33—22		
		SR 1371	30	52— 84	17— 0	8	1,25
4	0,25	SR 1283	30	96—182	40—56	10	
	E 600 i.v.	SR 1283	30	98—114	52—56	20	
		SR 1371	30	90—232	56—66	130	
		SR 1367	30	102—102	50—54	14	
		SR 1371	30	110—200	54—72	261	
		SR 1367	30	108—140	56—60	75	3,04
5	1,0	SR 1371	30	92—136	36—42	20	
	E 600 i.v.	SR 1371	30	100—140	24—26	45	
		SR 1371	30	96— 90	22—16		
		SR 1371	30	90—200	16—20	40	3,25
6	4,0	SR 1371	30	100—248	30—50	73	
	E 605 i.v.	SR 1371	30	92—144	24—26	56	
		SR 1371	30	98—144	13—17	155	24,6
7	4,0	SR 1283	30	100—112	60—58	34	
	E 605 i.v.	SR 1283	30	100—180	50—46	114	16,0
8	4,0	SR 1367	30	80— 80	24—26	6	
	E 605 i.v.	SR 1367	30	68— 72	28—32	20	8,33
9	4,0	SR 1371	30	96—132	18—24	25	
	E 605 i.v.	SR 1371	30	128—144	20—22	115	24,0

$t = 3{,}09$; $n - 2 = 11$). SR 1371 besitzt demnach keine eindeutige Schutzwirkung gegen eine Eserinvergiftung.

Trotz dieser offensichtlichen Spezifität der Antidot-Behandlung für Vergiftungen mit Alkylphosphaten ist der Erfolg — gemessen an der Erhöhung der Toleranzdosis (um das 3—4fache) — eigentlich nicht befriedigend. Wir hatten den Eindruck, daß insbesondere die unter der Vergiftung auftretende Atemdepression

Tabelle 3

Versuch Nr.	Infusionsgeschw. mg/kg/Std Eserin i.v.	Antidot		Tödliche Gesamtdosis mg/kg Eserin
		Stoff	Dosis mg/kg	
1	1,0	SR 1371	7×30	3,07
2	1,0	SR 1371	6×30	1,71
3	1,0	SR 1371	3×30	1,37
4	1,0	SR 1371	3×30	3,5

nicht immer auf die Antidotgaben anspricht (vgl. auch Abb. 1). Auf dieses Problem muß später noch eingegangen werden. Zunächst sollte in parallel angesetzten Versuchsreihen ermittelt werden, inwieweit sich der Behandlungserfolg von SR 1371 durch Kombination mit Atropin und/oder künstlicher Beatmung steigern läßt, wobei die „maximale Behandlungsleistung" wohl auch ein praktisches Interesse verdient.

2. Kombination der spezifischen Gegenbehandlung mit anderen therapeutischen Maßnahmen. In einer statistisch auswertbaren Versuchsreihe wurden an Meerschweinchen intravenöse Dauerinfusionen mit dem Alkylphosphat DFP (Diisopropylfluorphosphat) durchgeführt. Die Letaldosen betrugen (Einzelheiten in Tab. 4):

ohne Gegenbehandlung $3{,}73 \pm 0{,}35$ mg/kg DFP
bei künstl. Beatmung $4{,}67 \pm 0{,}39$ mg/kg DFP
($t = 2{,}479$ $p < 0{,}05 > 0{,}01$)
unter Atropinschutz $6{,}92 \pm 1{,}18$ mg/kg DFP
($t = 6{,}340$ $p < 0{,}001$)
unter PAM-Schutz $12{,}92 \pm 4{,}38$ mg/kg DFP
($t = 5{,}275$ $p < 0{,}001$)

Bei der Vergiftung mit DFP zeigt PAM (SR 1371) demnach eine deutliche Überlegenheit gegenüber anderen Behandlungsmaßnahmen, doch ist die Toxicität auch hier nur auf ein Drittel bis ein Viertel vermindert worden. Durch die *kombinierte* Anwendung von SR 1371 und Atropin bei gleichzeitiger künstlicher Beatmung erhöht sich dagegen die tödliche Dosis von DFP auf

$$77{,}7 \pm 19{,}7 \text{ mg/kg } (t = 5{,}275 \; p < 0{,}001),$$

also auf den etwa 20fachen Wert (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4

Versuch Nr.	Infusionsgeschw. DFP i.v. mg/kg/Std	Künstliche Atmung	Atropin mg/kg i.p.	SR 1371 mg/kg i.v.	Tödliche DFP Gesamtdosis mg/kg
1	0,5				3,36
2	1,0				3,48
3	1,0				3,66
4	2,0				4,29
5	2,5				3,92
6	2,5				3,97
1	1,0	+			4,88
2	2,0	+			5,03
3	2,0	+			4,76
4	2,0	+			4,14
1	2,0		3×1		5,27
2	2,0		3×1		7,35
3	2,0		3×1		7,23
4	2,0		3×1		7,84
1	2,5			3×30	13,4
2	2,5			4×30	16,0
3	2,5			2×30	6,58
4	2,5			9×30	15,7
1	10,0	+	8×1	2×30	71,0
2	10,0	+	4×1	3×30	56,3
3	10,0	+	4×2	4×30	81,5
4	10,0	+	5×2	3×30	102,1

Gegenüber einer Vergiftung mit E 600 erreicht eine solche kombinierte Behandlung sogar noch weit höhere Toleranzdosen: hier konnten die Letaldosen bis auf das 190fache gesteigert werden! Vgl. hierzu Tab. 5.

Auch bei der Dauerinfusion mit E 605 (1 Versuch) ließ eine „kombinierte Behandlung" die tödliche Gesamtdosis von 8,6 auf über 500 mg/kg, also auf den etwa 60fachen Wert ansteigen. Bei einem Vergleich der Tab. 4 und 1 würden sich diese erstaunlichen Behandlungserfolge allerdings zum Teil auch damit erklären lassen, daß im Falle der E-Stoffe die künstliche Beatmung allein schon eine beachtliche lebensverlängernde Wirkung zu besitzen scheint.

Tabelle 5

Versuch Nr.	Infusionsgeschw. E 600 i.v. mg/kg/Std [1]	Künstliche Atmung	Atropin i.p. mg/kg	SR 1371 i.v. mg/kg	Tödliche E 600 Gesamtdosis mg/kg
1	2	+	22	270	14,33
2	4	+	22	320	> 152,33
3	4	+	18	330	108,0

[1] Im Verlauf des Versuches wurde nach der ersten SR-Gabe mehrfach zusätzlich E 600 intravenös injiziert.

3. Das Elektrokardiogramm bei Vergiftung und Gegenbehandlung. Bei allen von uns durchgeführten Versuchen war das Elektrokardiogramm fortlaufend kontrolliert und intermittierend registriert worden. Die Ableitung erfolgte mit Einstichelektroden an der Brustwand. Registriert wurde mit dem *Siemens*-Zweikoffergerät.

Die bekannten EKG-Veränderungen im Verlaufe einer Alkylphosphatvergiftung (Salerno u. Coon 1949; Enders 1952, Jantzen 1952) beginnen mit einer Verzögerung der Überleitung und führen dann über einen partiellen AV-Block (z. T. als Wenckebach-Periodik) bis zur vollständigen atrio-ventrikulären Dissoziation. Durch SR 1371 (PAM, 30 mg/kg i.v.) werden diese toxischen Reizleitungsstörungen *schlagartig* beseitigt (Abb. 2). Einen ähnlichen Effekt hat auch die intravenöse Injektion von 0,5 mg/kg Atropin (vgl. Salerno u. Coon 1949). SR 1283

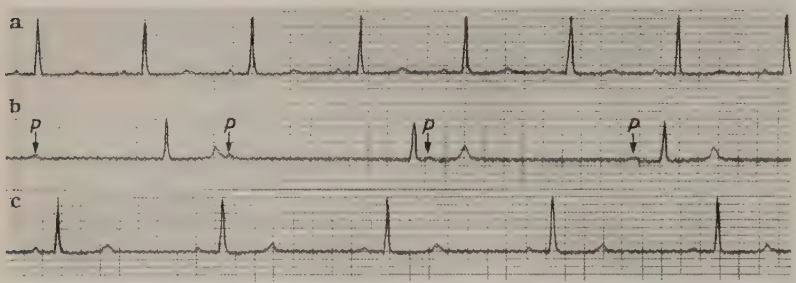


Abb. 2. Elektrokardiogramm eines betäubten Meerschweinchens während protahierter Vergiftung mit Parathion. Zeitschreibung 1/20 sec. *a* Normales EKG vor der Vergiftung. Frequenz 218 /min. *b* Stadium schwerer Parathion-Vergiftung. Frequenz 96/min. *c* Normalisierung des EKG durch PAM (30 mg/kg i.v. Frequenz 139/min)

(Wilson-Körper) und SR 1367 sind dagegen unwirksam. Aufgetretene Zeichen eines Herzinnenschichtschadens (ST-Senkung und praeterminal negatives T) verschwinden nach SR 1371 ebenfalls, allerdings nicht so unmittelbar wie die Überleitungsstörungen.

Eine Eigenwirkung der SR-Stoffe auf das normale Meerschweinchen-EKG konnte von uns nicht festgestellt werden.

Es liegt nahe, die beschriebenen EKG-Veränderungen bei der Vergiftung mit Alkylphosphaten mit den bekannten Erscheinungen einer Erregung im parasympathischen System, speziell mit dem N. vagus in Verbindung zu bringen. Zur Analyse einer solchen Wirkungsweise war es notwendig zu prüfen, ob die typischen EKG-Veränderungen (und eine Beeinflussung durch Antidotgaben) auch am zuvor vagotomierten Tier zu beobachten sind. Aus einem Vergleich der letalen Titrationswerte von intakten und vagotomierten Tieren würde sich ferner ablesen lassen, ob dem N. vagus für den Verlauf der Alkylphosphat-Vergiftung eine so bedeutungsvolle Rolle zukommt, wie allgemein angenommen wird.

4. Vergiftung und Gegenbehandlung am vagotomierten Tier. Die betäubten Meerschweinchen wurden zweizeitig (35 und 5 min) vor Infusionsbeginn bivagotomiert. Nach diesem Eingriff liegen die Werte für die Pulsfrequenz mit 300/min um etwa 20% höher als am nicht vagotomierten Tier, während die Atemfrequenz von 40/min auf Werte zwischen 20 und 30/min absinkt.

Dauerinfusionen mit Paraoxon (E 600) führten auch am vagotomierten Tier zu Bradykardien und den zuvor beschriebenen, typischen EKG-Veränderungen. Diese Vergiftungssymptome treten — im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen am intakten Tier — jedoch relativ spät und dann abrupt auf. Sie werden durch eine sofort erfolgende Injektion von PAM (SR 1371, 30 mg/kg i. v.) ebenso wie am intakten Tier schlagartig beseitigt. Eine lebensverlängernde Wirkung läßt sich mit dieser Behandlung jedoch nicht erzielen: aus den in Tab. 6 (Versuch 1—7) wiedergegebenen letalen Titrationswerten ergibt sich ein Mittelwert

$$0{,}85 \pm 0{,}18 \text{ mg/kg E 600},$$

der von dem an intakten Tieren (ohne Gegenbehandlung) ermittelten Mittelwert ($0{,}77 \pm 0{,}26$ mg/kg, vgl. Tab. 1) nicht signifikant abweicht ($n - 2 = 21$; $t = 0{,}73$; $p > 0{,}05$).

Tabelle 6

Versuch Nr.	Infusionsgeschw. E 600 i.v. mg/kg/Std	Vagotomie	SR 1371 mg/kg	Künstliche Atmung	Tödliche Gesamtdosis mg/kg
1	0,8	+	30		0,66
2	0,4	+	30		0,74
3	0,4	+	60		1,13
4	0,4	+	60		0,9
5	0,4	+	60		0,96
6	0,4	+	60		0,91
7	0,4	+	30		0,63
8	1,0	+	150	+	14,65
9	15,0	+	90	+	56,25

Es war schon früher (S. 8) darauf hingewiesen worden, daß sich die unter der Alkylphosphat-Vergiftung einstellende Atemdepression durch PAM nicht immer befriedigend beeinflussen läßt, so daß als letzte Todesursache in jedem Falle die Atemlähmung zu betrachten ist. Diesem Befund entsprechen die guten Behandlungserfolge (mit PAM und Atropin) bei gleichzeitiger künstlicher Beatmung (vgl. Tab. 4 und 5). Am vagotomierten Tier scheint nun die Spontanatmung von Versuchsbeginn an unzureichend zu sein (siehe oben). Vermutlich wird sie im Laufe der Vergiftung mit E 600 so schlecht, daß die bei der (späten!) Bradykardie injizierte Antidotgabe (PAM) die schon fortgeschrittene Atemdepression nicht mehr aufzuhalten vermag.

Unter gleichzeitiger künstlicher Beatmung verschiebt PAM die Letaldosen von E 600 auch am vagotomierten Tier eindeutig zu höheren Werten hin (vgl. Tab. 6, Versuch Nr. 8 u. 9).

II. Versuche an isolierten Organen

Im Verlaufe einer protrahierten Vergiftung mit Alkylphosphaten kommt es zu charakteristischen Veränderungen in der Herztätigkeit (Frequenz und EKG), die durch intravenöse Injektion des Antidots PAM leicht zu beseitigen sind. Dieser

Antagonismus ist unabhängig vom Herzvagus (siehe unter I, d) und scheint sich somit direkt am Herzen abzuspielen. Zur Prüfung dieser Frage wurden ergänzende Versuche an isolierten Herzen durchgeführt.

1. Vergiftung und Gegenbehandlung am isolierten Herzen. Es wurden zunächst die Eigenwirkungen der Alkylphosphate Paraoxon und Parathion sowie die des Antidots ermittelt. Danach erfolgten jeweils die antagonistischen Versuche.

a) Straub-*Herz* (10). Am isolierten Froschherzen führen Paraoxon in Konzentrationen ab $1—2 \cdot 10^{-4}$, Parathion in Konzentrationen ab $2—3 \cdot 10^{-4}$ zu einer

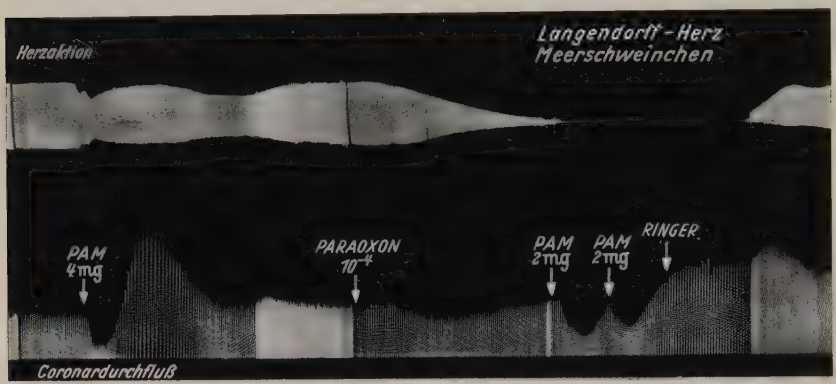


Abb. 3. Isoliertes Meerschweinchenherz nach Langendorff. Registrierung von Herzaktion und Coronardurchfluß (Ordinatenschreiber). Eigenwirkungen von PAM. Paraoxon (10^{-4}) führt zu einer Abnahme der Herzaktion bis zum Stillstand. Keine Antidotwirkung von PAM, dagegen völlige Reversibilität nach Durchströmen mit Ringer-Lösung

Abnahme der Hubhöhe auf 50—25% des Ausgangswertes. Diese Wirkung ist leicht auswaschbar.

SR 1371 (PAM) besitzt — ebenso wie die parallel geprüften Präparate SR 1283 (Wilsonkörper) und SR 1367 — in Konzentrationen ab 10^{-3} hemmende Eigenwirkungen auf die Hubhöhe des Herzens. Auch diese Wirkung ist leicht auswaschbar.

Infolge der Auswaschbarkeit von Paraoxon und Parathion konnte bei der Prüfung der antagonistischen Wirksamkeit von SR 1371 die Alkylphosphat-Lösung in der Straub-Kanüle nicht durch eine SR-Lösung ersetzt werden, weil dann auch der Auswascheffekt zu Geltung gekommen wäre. Es wurden daher zur wirksamen Giftlösung in der Straub-Kanüle jeweils 0,5 cm³ der SR-Lösung (verschiedener Konzentration) zugegeben.

An einem durch Paraoxon oder Parathion geschädigten Froschherzen wird durch Zugabe von 0,5 cm³ einer SR 1371-Lösung die Hubhöhe um etwa 30% gesteigert. Dieser Effekt ist unabhängig von der SR-Konzentration und läßt sich auch mit der gleichen Menge zugesetzter Ringer-Lösung erzielen. Es handelt sich also um einen unspezifischen Verdünnungseffekt.

b) Langendorff-*Herz* (10). Isolierte Meerschweinchen-Herzen wurden in einer modifizierten Apparatur nach Langendorff durchströmt. Die zu prüfenden Antidote wurden mit einem dünnen Polyäthylenkatheter direkt vor das Herz gebracht. Registriert wurden Hubhöhe und Coronardurchfluß (Tropfenzahl mittels Ordinatenschreiber[1].

[1] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Ordinatenschreibers als Leihgabe.

Die Alkylphosphate Paraoxon und Parathion führen in Grenzkonzentrationen ab 10^{-4} zu einer allmählichen Abnahme der Hubhöhe bis zum völligen Herzstillstand. Der Coronardurchfluß wird zunächst beschleunigt und kehrt dann wieder auf den Ausgangswert zurück.

Die Eigenwirkungen von SR 1371 (PAM) in Dosen ab 2 mg bestehen in einer flüchtigen Abnahme der Hubhöhe um 20% und einer kurzfristigen Durchflußbeschleunigung um 50%.

Das mit Alkylphosphat durchströmte Herz wird durch Behandlung mit SR 1371 nicht im Sinne einer antagonistischen oder entgiftenden Wirkung beeinflußt: der Coronardurchfluß ändert sich nur entsprechend der oben beschriebenen Eigenwirkungen von SR 1371. Auch durch Atropin (geprüft bis 2 mg) ist die Alkylphosphat-Schädigung des isolierten Herzens nicht zu beeinflussen. Sie läßt sich jedoch ohne weiteres auswaschen (vgl. Abb. 3).

Die am intakten Tier zu beobachtenden Herzwirkungen der Alkylphosphate lassen sich am isolierten Herzen also nicht reproduzieren. Die hier erst mit ungewöhnlich hohen Konzentrationen ($> 10^{-4}$!) zu erzielenden Effekte sind jedenfalls nicht auf eine Cholinesterase-Hemmung zurückzuführen, sondern unspezifisch, da sie

1. auswaschbar und
2. weder durch das spezifische Antidot PAM noch durch Atropin zu beseitigen sind.

c) Herzvorhof (24). Am isolierten Herzvorhof des Meerschweinchens und Kaninchens führen Paraoxen-Konzentrationen ab $1—2 \cdot 10^{-6}$ innerhalb weniger Minuten zu einer Abnahme von Hubhöhe (um 90%) und Frequenz (um 45%). Diese Wirkungen sind *nicht* auswaschbar, durch Atropin ($2 \cdot 10^{-6}$) oder durch PAM ($1 \cdot 10^{-4}$) jedoch schnell zu beseitigen (Abb. 4a u. 4b).

Im Gegensatz zu den am Straub- und Langendorff-Herzen erhobenen Befunde zeigen sich also bei Verwendung der Methodik des isolierten Vorhofs Herzwirkungen der Alkylphosphate, die den in vivo zu beobachtenden Effekten entsprechen: Der von DFP- oder Paraoxon-vergifteten Meerschweinchen gewonnene Herzvorhof bleibt auch in vitro bradykard[1]. Dieser langsame Vorhofrhythmus ist nicht auswaschbar, er wird durch Atropin oder PAM jedoch in eine normale Frequenz überführt (vgl. Abb. 5). *Die Herzwirkungen der Alkylphosphate sind u. E. demnach als Folge einer cholinesterasehemmenden Wirkung dieser Substanzen im Gebiet der Reizbildung des Herzens zu betrachten.* Daß sich diese an isolierten Herzen nicht zeigen (II. a, 1. u. 2.), ist ein Problem, das vermutlich methodisch zu lösen sein wird (vielleicht stellt die Vorhof*dehnung* den zusätzlich notwendigen

[1] Obwohl das Herz im Verlauf einer Alkylphosphat-Vergiftung bei einer Kammerfrequenz von etwa 50/min entnommen wird, hat der isolierte Vorhof im sauerstoffdurchperlten Bad noch einen Rhythmus von über 100/min. Hierbei ist zu berücksichtigen, das der Vorhof bei schwerer Alkylphosphat-Bradykardie auch in vivo eine höhere Frequenz als die Kammer hat (z. B. 2:1 AV-Block). Außerdem ist die Reizbildung in situ durch Sauerstoffmangel infolge gleichzeitiger Atemdepression wohl weiteren Schädigungen ausgesetzt.

Abb. 4. Isolierter Meerschweinchenvorhof. Abnahme von Amplitude und Frequenz nach Paraoxon 10^{-6}. Diese Wirkungen sind nicht auswaschbar, jedoch schlagartig zu beseitigen durch: *a* Atropin $2 \cdot 10^{-6}$ oder *b* PAM 10^{-4}

Faktor für die den Herzrhythmus steuernden ganglionären Elemente dar?)[1].

[1] Die Diskrepanz zwischen der Empfindlichkeit von isolierten Herzen und isolierten Herzvorhöfen gegenüber cholinesterasehemmenden Substanzen läßt sich mit zahlreichen Literaturstellen belegen: Der Herzvorhof spricht im allgemeinen schon auf Konzentrationen von 10^{-6} an (z. B. Webb 1950, Burn 1954), das Straub-Herz (z. B. Enders, 1952) und das Langendorf-Herz (z. B. Salerno u. Coon, 1949) dagegen erst auf Konzentrationen von 10^{-4} und mehr. Eine Ausnahme stellt der Befund von Genuit (1941) dar, der am Langendorff-Herzen mit Eserin schon bei einer Konzentration von 10^{-5} cholinerge Wirkungen sah; hier wurde das Präparat allerdings — im Gegensatz zur sonst üblichen Methodik — im geschlossenen System perfundiert. Am Herz-Lungenpräparat führen Eserin, Prostigmin und Paraoxon in Konzentrationen ab $1 \cdot 10^{-6}$ zur Frequenzabnahme und Verminderung des Schlagvolumens, die durch Atropin aufhebbar sind (Burn u. Walker 1954, Burn, Williams u. Walker 1955).

Unsere, auf die Befunde am isolierten Herzvorhof gestützte Deutung der Herzwirkungen von Alkylphosphaten steht im Widerspruch zu der bisher üblichen Anschauung (Zusammenfassende Darstellungen bei Salerno u. Coon 1949; Koelle u. Gilman 1949; Heymans, Pochet u. van Houtte 1956). Salerno u. Coon, die sich mit diesem Problem besonders beschäftigt haben, entwickelten folgenden Gedankengang:

„Am intakten Tier können die Herzwirkungen der geprüften Substanzen (HETP, TEPP, DFP, Eserin und Prostigmin) mit einer Anhäufung von Acetyl-

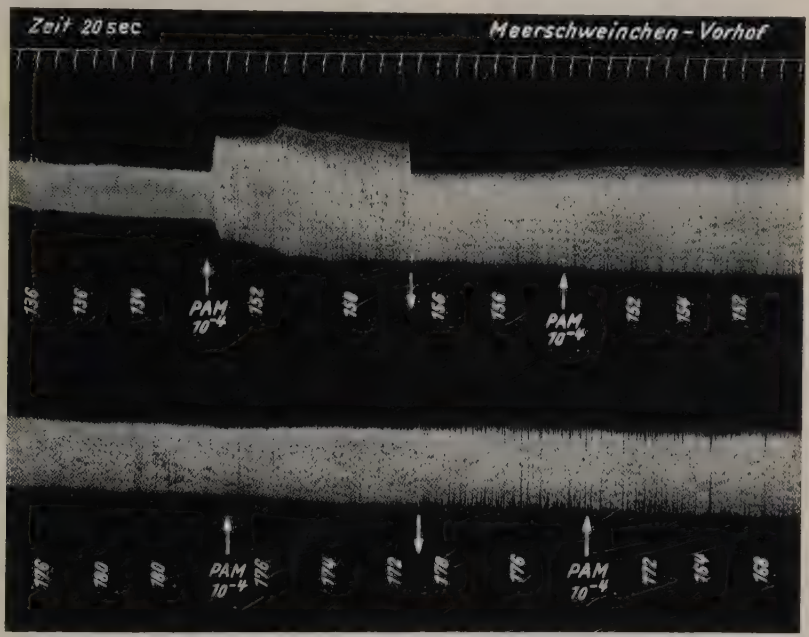


Abb. 5. Isolierter Meerschweinchenvorhof. Obere Kurve: Vorhof eines Meerschweinchens, das in 2 Std mit 3,8 mg/kg DFP i.v. protrahiert vergiftet und bei einer Bradykardie von 56/min getötet wurde. Die auch in vitro bestehenbleibende Depression des Vorhofs wird durch PAM (10^{-4}) beseitigt (Ansteigen von Frequenz und Amplitude). Durch Atropin ($2 \cdot 10^{-6}$) konnte im weiteren Verlauf des Versuches keine zusätzliche Wirkung erzielt werden. Untere Kurve: Am Vorhof eines nicht vorbehandelten Meerschweinchens ist PAM ohne Eigenwirkung. Atropin ($2 \cdot 10^{-6}$) ließ im weiteren Verlauf des Versuchs ebenfalls keine Eigenwirkung erkennen

cholin erklärt werden. Da diese Effekte durch Vagotomie nicht, wohl aber durch Atropin zu verhüten oder aufzuheben sind, und sie am isolierten Herzen nicht auftreten, muß man schließen, daß das angehäufte Acetylcholin auf dem Wege über den Kreislauf zum Herzen gelangt und nicht etwa Folge einer durch die Anticholinesterasen bewirkten Erregung der parasympathischen Herzganglien ist".

Wir haben im folgenden diese Hypothese experimentell überprüft.

2. Versuche zum Nachweis von Acetylcholin im Blut vergifteter Tiere. Meerschweinchen wurden wie in den oben beschriebenen Versuchen mittels i.v. Dauerinfusion von Paraoxon vergiftet. Sie wurden, um eine möglichst große Giftmenge infundieren zu können, zum Teil künstlich beatmet. Bei starker Bradykardie (< 30/min) wurde der Thorax eröffnet und aus dem Herzen heparinisiertes Blut entnommen.

Am Froschrectus (15 Versuche) erfolgt auf Zugabe von isotonisch gemachtem Meerschweinchenplasma — sowohl vor wie nach E 600-Vergiftung — keine Reaktion (1 cm^3 Plasma zum 10 cm^3-Bad). Am Straub-Herz (21 Versuche), das empfindlicher aber nicht so spezifisch wie der Froschrectus auf Acetylcholin reagiert, beobachtet man nach Plasma-Zugabe eine Abnahme der Hubhöhe bei gleichbleibender oder sogar gesteigerter Frequenz. Die Depression ist flüchtig und wird von einer längeranhaltenden Steigerung der Hubhöhe gefolgt. Dieser Befund ist unabhängig davon zu erheben, ob das Blut vor oder nach der Paraoxon-Vergiftung entnommen wurde. Eine nachträgliche Zerstörung von Acetylcholin im Plasma durch einen Rest vielleicht noch aktiver Cholinesterase konnte ausgeschlossen werden: zugesetztes Acetylcholin (10^{-8}) war in einem in dieser Weise mit Paraoxon vergifteten Plasma noch mehrere Stunden später nachzuweisen.

Die von Salerno u. Coon theoretisch abgeleitete Erklärung für die Herzwirkungen von Alkylphosphaten erscheint auch nach diesen Versuchen widerlegt: Weder Acetycholin noch ein anderer herzwirksamer Stoff kreist im Blute von mit Alkylphosphat vergifteten Tieren. Die toxische Bradykardie bei der Vergiftung mit Phosphorsäureestern beruht — wie die Versuche am isolierten Herzvorhof beweisen — auf einem direkten Angriff des Alkylphosphates auf die den Herzrhythmus steuernden Mechanismen im Sinne einer Cholinesterasehemmung. Diese Deutung würde die antagonistische Wirkung von Atropin am mit Alkylphosphat vergifteten Herzen des intakten *und vagotomierten* Tieres erklären können, nicht jedoch die überaus schnelle Wirkung von PAM, da *die Reaktivierung der durch Alkylphosphate blockierten Esterase einem gewissen Zeitfaktor unterworfen ist.*

Es sei an dieser Stelle auf die Befunde von Loomis (1956) hingewiesen. Dieser Autor fand ähnlich unseren Befunden (l.c), daß die i.v. Injektion von PAM (10 mg/kg) am mit dem Alkylphosphat Sarin vergifteten (und künstlich beatmeten) Hund innerhalb 30—60 sec zu einer Beseitigung des depressorischen und pulsverlangsamenden Wirkung von Sarin führt. Aus weiteren Befunden von Loomis geht hervor, daß eine *völlige* Reaktivierung der blockierten Cholinesterase durch PAM einen Zeitfaktor von mindestens 30—60 min benötigt.

Wir schließen daraus, daß PAM neben seiner spezifischen Wirkung auf die blockierte Esterase noch weitere bisher nicht beachtete Eigenschaften besitzt. Die Eigenwirkungen von PAM gegenüber Acetylcholin sollen im folgenden dargestellt werden.

3. PAM und Acetylcholin an isolierten Organen. Geprüft wurden die Eigenwirkungen von PAM sowie der Einfluß von PAM auf die durch Acetylcholin (A. Ch.) ausgelösten Reaktionen am isolierten Froschrectus, am isolierten Froschherzen nach Straub sowie am isolierten Kaninchendarm nach Magnus.

a) Froschrectus (6). PAM (SR 1371) besitzt an diesem Präparat keinerlei Eigenwirkungen, es verstärkt jedoch die durch A.Ch. ($3—6 \cdot 10^{-8}$) ausgelösten Kontrakturen, und zwar in Konzentrationen ab $3 \cdot 10^{-6}$ um 50%, ab $3 \cdot 10^{-5}$ um 300% und ab $3 \cdot 10^{-4}$ um 400%. Durch mehrmaliges Auswaschen ist eine volle Reversibilität zu erzielen.

Auch die parallel geprüften Präparate SR 1283 (NHMJ, Wilson-Körper) und SR 1367 besitzen eine *sensibilisierende Wirkung für A.Ch.*: Die Kontrakturen

werden durch SR 1283 in Konzentrationen ab $3 \cdot 10^{-4}$ um 50%, durch SR 1367 in Konzentrationen ab $3 \cdot 10^{-4}$ um 100% gesteigert.

Aus den Versuchen geht hervor: 1. daß Acetylcholin durch die geprüften esterasereaktivierenden Substanzen nicht zerstört wird, und 2. daß die SR-Präparate — und vor allem der wirksamste Esterase-Reaktivator PAM — eine cholinesterasehemmende Eigenwirkung besitzen. Letzteres ist im Hinblick auf die notwendige Esterase-Affinität dieser Verbindungen durchaus verständlich und auch von Wirth (Warburg-Versuche, mündliche Mitteilung), Friedberg und Sakai (unveröffentlichte Warburg-Versuche) bestätigt worden.

b) Froschherz (4). Über die Eigenwirkungen von PAM ist oben berichtet worden (vgl. II., a, 1.). Die durch Acetylcholin in Konzentrationen ab 10^{-8} auslösbaren negativ inotropen und chronotropen Wirkungen lassen sich durch PAM-Zugabe oder -Vorbehandlung (ab $2 \cdot 10^{-4}$) aufheben bzw. verhüten.

Es tritt hier eine Anti-Acetylcholinwirkung von PAM hervor, die aber nicht auf einer Zerstörung von A.Ch. beruhen kann (vgl. II., c, 1.), sondern wohl als atropinartiger Effekt aufzufassen ist. Ein solcher Wirkungsmechanismus wird sich am isolierten Darmstreifen erkennen lassen.

c) Kaninchendarm (4). Die Eigenwirkungen von PAM beginnen in Konzentrationen ab $4 \cdot 10^{-5}$ im Sinne einer leichten Erregung von Motilität und Tonus (Folge einer Ch.E.-Hemmung? Vgl. II., c, 1.). In Konzentrationen ab 10^{-3} werden hemmende Effekte beobachtet. Diese Eigenwirkungen von PAM sind leicht auswaschbar.

Die durch A.Ch. ($7 \cdot 10^{-8}$) ausgelösten Darmerregungen werden durch PAM in Konzentrationen ab $4 \cdot 10^{-5}$ zunehmend gehemmt (völlige Aufhebung ab $4 \cdot 10^{-4}$). Eine Hemmung der durch $BaCl_2$ ausgelösten Darmerregung wurde in diesem Konzentrationsbereich von PAM (geprüft bis $8 \cdot 10^{-4}$) dagegen nicht gefunden.

Der Versuch bestätigt somit die unter II., c, 2. beschriebenen *atropinartigen Wirkungen von PAM* (Antagonismus gegen A.Ch., nicht aber gegen das direkt muskulär erregende Barium).

d) Herzvorhof (4). Im Bereich der uns interessierenden Konzentrationen ($1—2 \cdot 10^{-4}$) besitzt PAM keine bemerkenswerten Eigenwirkungen (vgl. Abb. 5). Die durch Acetylcholin ($2 \cdot 10^{-8}$) oder Doryl ($2 \cdot 10^{-8}$) auslösbaren

Abb. 6. Isolierter Meerschweinchenvorhof. Die Dorylwirkung ($2 \cdot 10^{-8}$) wird durch PAM (10^{-4}) aufgehoben. Im Gegensatz zu Atropin ($2 \cdot 10^{-4}$) ist diese „atropinartige" Wirkung von PAM auswaschbar. Näheres vgl. im Text

negativ inotropen und chronotropen Wirkungen lassen sich durch PAM ($1—2 \cdot 10^{-4}$) aufheben (vgl. Abb. 6). Diese atropinartige Wirkung von PAM ist — im Gegensatz zur Atropinwirkung selbst — auswaschbar (vgl. Abb. 6).

Mit der atropinartigen Wirkung von PAM[1] würde konzentrationsmäßig auch am lebenden Tier zu rechnen sein (30 mg/kg PAM i.v. entsprechen einer Blutkonzentration von etwa $3 \cdot 10^{-4}$ bis $3 \cdot 10^{-5}$). Die überaus schnelle Beseitigung der durch Alkylphosphate ausgelösten Bradykardie (und der EKG-Veränderungen) könnte wohl auf diesen atropinartigen Effekt zurückgeführt werden, zumal die Fermentreaktivierung durch PAM gewissen zeitlichen Bedingungen unterworfen ist. Doch würde die Reaktivierung der blockierten Esterase den atropinartigen Effekt ablösen. Die häufig der Bradykardie folgende Atemlähmung läßt sich durch Atropin oder durch die atropinartige Wirkung von PAM natürlich nicht aufhalten, wohl aber vermutlich durch eine Fermentreaktivierung beseitigen. Das würde bedeuten, daß im Zeitraum zwischen beginnender Atemlähmung und der einer PAM-Injektion folgenden Fermentreaktivierung die künstliche Beatmung unerläßlich, weil allein lebensrettend ist.

Diskussion

Da im Vorangehenden jeweils die den Gang der experimentellen Untersuchung bestimmenden Gedanken ausführlich dargelegt wurden, kann sich die Diskussion auf die kritische Besprechung folgender Fragen beschränken:

1. Ist die spezifische Antidot-Behandlung bei Vergiftungen mit Alkylphosphaten der symptomatischen Behandlung überlegen?
2. Wie ist die Antidotwirkung von PAM auf die durch Alkylphosphate bewirkte Atemdepression zu beurteilen?
3. Mit welchen Eigenwirkungen von PAM ist pharmakologisch zu rechnen?

Zu 1.: Einen Überblick über den therapeutischen Wert verschiedener Behandlungsmaßnahmen bei der Vergiftung mit Alkylphosphaten (und Eserin) gibt die Zusammenstellung unserer unter gleichen methodischen Voraussetzungen erhaltenen Ergebnisse an Meerschweinchen (protrahierte Vergiftungen mittels i.v. Dauerinfusionen).

Dabei zeigt sich im Falle von Vergiftungen mit Alkylphosphaten eine deutliche Überlegenheit von PAM gegenüber der (symptomatischen) Atropinbehandlung, während bei Vergiftungen mit Eserin dem Atropin

[1] Eine atropinartige Wirkung von PAM wird von Kewitz, Wilson u. Nachmansohn (1957) bestritten, weil sich in Versuchen an der eviscerierten Katze die A.Ch.-Wirkung auf den Blutdruck durch PAM nicht aufheben ließ (100 mg/kg PAM i.v.). Möglicherweise ist die geprüfte PAM-Dosis jedoch so hoch, daß hier die cholinesteraschemmenden Eigenschaften von PAM stärker in den Vordergrund treten als seine atropinartigen Wirkungen?

eine wesentlich größere therapeutische Bedeutung zukommt als PAM. Die aus diesem Befund herauslesbare Spezifität der PAM-Wirkung gegen die Alkylphosphat-Vergiftung stimmt mit den biochemischen Vorstellungen von Nachmansohn, Wilson u. Mitarb. (vgl. S. 3) überein.

Tabelle 7. *Einfluß therapeutischer Maßnahmen auf die Toxicität von Esteraseblockern*

Vergiftung mit \ Behandlung mit	ohne	Künstliche Beatmung	Atropin	PAM	Künstliche Beatmung Atropin und PAM
Paraoxon	1,0	—	2,6	4,0[1]	>100,0[1]
Parathion	1,0	6,1	—	3,0[1]	70,0[1]
DFP	1,0	1,2	1,8	3,5	20,7
Eserin	1,0	1,2	7,8	1,3	—

[1] Mittelwerte aus weniger als 4 Versuchen.

Die mit NHMJ („Wilson-Körper") und Pyridinaldoxim erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 7 nicht berücksichtigt, da der Antidoteffekt dieser Substanzen hinter dem von PAM weit zurückbleibt. Dies ist im Falle von NHMJ schon länger bekannt und im Falle des Pyridinaldoxim (als dem tertiären Analogen von PAM) nur deswegen interessant, weil daraus hervorgeht, daß die kationische Ladung des Reaktivators eine wesentliche Voraussetzung für seine Aktivität darstellt. Auch dieses Ergebnis entspricht den Vorstellungen über den biochemischen Wirkungsmechanismus der spezifischen Antidote.

Trotz der Spezifität der PAM-Behandlung ist der Effekt — gemessen an der Erhöhung der letalen Alkylphosphatmengen — eigentlich noch enttäuschend gering. Aus der Tab. 7 (und ebenso aus den Versuchen an vagotomierten Tieren, die eine reduzierte Spontanatmung besitzen: vgl. unter I. d) läßt sich ablesen, daß hierfür vor allem die durch PAM nur schwer aufhebbare atmungsbeeinträchtigende Wirkung der Alkylphosphate verantwortlich zu machen ist.

Zu 2.: Es liegt nahe anzunehmen, daß die erst mit Latenz einsetzende PAM-Wirkung auf die durch Alkylphosphate bewirkte Atemdepression mit der Geschwindigkeit der Enzymreaktivierung zusammenhängt (vgl. unter II. c, 4). Wenn die Atemlähmung zentral bedingt sein sollte, so wäre ferner daran zu denken, daß die Passage der Blut-Hirn-Schranke für PAM als quarternärer Verbindung erschwert sein mag. Nach den Befunden von Kewitz u. Nachmansohn (1957) wird tatsächlich die nach Alkylphosphatgaben gehemmte Hirnesterase durch PAM *in vivo* nicht meßbar reaktiviert, wohl aber *in vitro*. Dies spricht eigentlich mehr dafür, daß für die Atemdepression bei der Alkylphosphat-Vergiftung im wesentlichen ein peripherer Angriffspunkt verantwortlich zu machen ist.

Zu 3.: Von Holmes u. Robins (1955) war außer der fermentreaktivierenden Wirkung ein curareartiger Effekt von PAM gefunden worden. Dieser Eigenschaft kommt jedoch pharmakologisch offenbar keine Bedeutung zu: zum Vergiftungsbild von PAM gehören nicht Lähmungen,

sondern motorische Erregungszustände bis zu generalisierten Krämpfen — möglicherweise als Ausdruck der cholinesterasehemmenden Eigenwirkungen von PAM (vgl. unter II. c, 1). Danach scheint PAM ein echter kompetitiver Hemmstoff für Acetylcholin an den Acetylcholin-Receptoren darzustellen. Dem entspricht schließlich auch die atropinartige Wirkung von PAM (vgl. unter II, c, 2, 3, 4), der bei der Alkylphosphat-Vergiftung — zumindest kurzfristig — ein antagonistischer Effekt zukommt.

Bei Vergiftungen mit Alkylphosphaten wird diese atropinartige, d. h. symptomatische Wirkung von PAM natürlich seinen spezifischen Antidoteffekt als Enzymreaktivator vorteilhaft unterstützen. Inzwischen ist auch über die erfolgreiche klinische Anwendung von PAM bei Parathion-Vergiftungen am Menschen berichtet worden (Namba 1957). Bei den in dieser Weise behandelten Alkylphosphat-Vergiftungen handelte es sich allerdings nur um mittelschwere Intoxikationen ohne Beeinträchtigung der Atmung. Dosen von 0,1—1,0 g PAM i.v. bewirkten eine schnelle Reaktivierung der durch Parathion gehemmten Cholinesterase.

Summary

The effect of specific antidotes during subacute poisoning by physostigmine or alkylphosphates (parathione, paraoxone, DFP) has been investigated on anesthetized guinea pigs. It was found, that among the used antidotes NHMJ (nicotine-hydroxamic-methjodide), PAM (pyridine 2-aldoxime-methjodide) and pyridine-aldoxime the PAM was the most effective compound.

1. The toxic bradycardia and the typical electrocardiographic changes produced by alkylphosphates were abolished quickly by i.v. injection of PAM. The depression of respiration was normalized only tardy and incompletely.

2. The lethal dosis of alkylphosphates is raised by PAM to the 4 times value, but the lethal dosis of physostigmine is unchanged.

3. A. strong protection against alkylphosphate poisoning was obtained by a combination of PAM with atropine and artificial respiration. The 160 times lethal dosis of paraoxone and the 20 times lethal dosis of DFP were tolerated.

4. On vagotomized guinea pigs (with reduced spontaneus respiration!) PAM has no protective effect. The same antidote effect as in intact animal was observed if artificial respiration was induced.

The cardiac actions of alkylphosphates were analyzed by investigations on isoletad heart preparations.

1. The isolated frog heart (Straub) and the isolated heart of guinea pig (Langendorff) were insensitive to high concentrations of paraoxone

or parathione (up to $1 \cdot 10^{-4}$ rps. $2 \cdot 10^{-4}$). This effect is not spezific because it is reversed by washing and not abolished by atropine or PAM.

2. On isolated auricle (guinea pig, rabbit) concentrations of paraoxone 10^{-6} caused bradycardia and depression in amplitude. This effect is not reversed by washing but abolished by atropine ($2 \cdot 10^{-6}$) or PAM (10^{-4}).

3. The bradycardia of isolated auricle of guinea pigs poisoned by paraoxone or DFP in vivo is also not reversed by washing but abolished by atropine ($2 \cdot 10^{-6}$) or PAM (10^{-4}).

4. The conception of Salerno and Coon (1949) that the cardiac effects of alkylphosphates are caused by accumulated acetylcholine reaching the heart by way of circulation was not confirmed experimentally.

Besides the reactivation of the cholinesterase inhibited by alkylphosphates PAM itself produced inhibition of cholinesterase (see frogs rectus) and atropine like effects (see frogs heart, guinea pigs auricle, and rabbit intestine). The pharmacologic importance of this side effect is discussed

Literatur

Burn, J. H.: VIII. Local hormones. Acetylcholine as a local hormone for ciliary movement and the heart. Pharmacol. Rev. **6**, 107 (1954). — Burn, J. H., and J. M. Walker: Anticholinesterases in the heart-lung-preparation. J. Physiol. **124**, 489 (1954). — Burn, J. H., E. M. V. Williams and J. M. Walker: The production of block and auricula fibrillation in the heart-lung-preparation by inhibitors of cholinesterase. Brit. Heart J. **17**, 431 (1955). — Enders, A.: Die Kreislaufwirkung des Parathions. Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 196 (1952). — Erdmann, W. D., u. L. Lendle: Toxizität und Elimination von esteraseblockenden Alkylphosphaten und Eserin bei Dauerinfusionen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 208 (1957). — Genuit, H.: Quantitative Untersuchungen über die Acetylcholinfreisetzung am Herzen bei elektrischer und pharmakologischer Vagusreizung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 561 (1941). — Heymans, C., A. Pochet et H. van Houtte: Contribution à la pharmacologie du sarin et du tabun. Arch. internat. Pharmacodynamie **104**, 293 (1956). — Holmes, R., and E. L. Robins: The reversal by oximes of neuromuscular block produced by anticholinesterases. Brit. J. Pharmacol. **10**, 490 (1955). — Holmstedt, B.: Synthesis and pharmacology of dimethylamidoethoxy-phosphoryl cyanide (tabun) together with a description of some allied anticholinesterase compounds containing the N-P bond. Acta physiol. scand. (Stockh.) **25**, Suppl. 90 (1951). — Jantzen, G.: Akute Vergiftung mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel E 605. Slg. Vergiftungsfälle/Arch. Toxikol. **14**, 165 (1952). — Kewitz, H., and I. B. Wilson: A spezific antidote against lethal alkylphosphate poisoning. I. Arch. of Biochem. a. Biophysics **60**, 261 (1956). —Kewitz, H., and D. Nachmansohn: A spezific antidote against lethal alkylphosphate poisoning. IV. Arch. of Biochem. a. Biophysics 1957 (im Druck). — Kewitz, H., I. B. Wilson and D. Nachmansohn: A specific antidote against lethal alkylphosphate poisoning. II. Arch. of Biochem. a. Biophysics 1957 (im Druck). —Koelle, G. B., and A. Gilman: Anticholinesterase drugs. Pharmacol. Rev. **1**, 166 (1949). — Loomis, T. A.: The effect of an aldoxime on

acute sarin poisoning. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **118**, 123 (1956). — Nachmansohn, D.: Die Rolle des Acetylcholins in den Elementarvorgängen der Nervenleitung. Erg. Physiol. **48**, 575 (1955). — Namba, T.: Causal therapy of alkylphosphate poisoning. Manuskript 1957 (im Druck). — Roy, B. B., and A. S. Kuperman: Reversal of the actions of tetraethyl pyrophosphate in surviving mammalian tissue. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **89**, 255 (1955). — Salerno, P. R., and J. M. Coon: A pharmacologic comparison of hexaethyl tetraphosphate (HETP) and tetraethyl pyrophosphate (TEPP) with physostigmine, neostigmine and DFP. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 240 (1949). — Webb, J. L.: The action of acetylcholine on the rabbit auricle. Brit. J. Pharmacol. **5**, 335 (1950). — Wilson, I. B.: Acetylcholinesterase. XIII. Reactivation of alkylphosphate-inhibited enzyme. J. of Biol. Chem. **199**, 113 (1952). —Wilson, I. B., and S. Ginsburg: Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates. Arch. of Biochem. a. Biophysics **54**, 569 (1955). — Wilson, I. B., and E. K. Meislich: Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates. J. Amer. Chem. Soc. **75**, 4628 (1953). — The reactivation of acetylcholinesterase by tetraethylpyrophosphate and diisopropylfluorphosphate. J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2383 (1955). — Wirth, W.: Zur Pharmakologie der insektiziden Phosphorsäureester. Dtsch. med. Wschr. **1954**, 1205.

Prof. Dr. L. Lendle, Pharmakologisches Institut der Universität, Göttingen, Geiststr. 9

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 23—33 (1957)

Aus dem Physiologischen Institut und dem Histologischen Institut der Universität Wien

Feinstrukturelle Veränderungen in der Lunge nach explosiver Dekompression und Kompression

Von

Hj. Kolder und L. Stockinger

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. März 1957)

„Explosive Dekompression" und „explosive Kompression" (expl. Dkp. und Kmp.) bezeichnen Änderungen des atmosphärischen Luftdruckes innerhalb sehr kurzer Zeit (Millisekunden). Die Wirkungen einer Druckerniedrigung auf Menschen und Laboratoriumstiere sind mehrfach untersucht worden (Lit. bei Hitchcock, Violette, Hall, Grognot, Kolder). Mit dem Erreichen sehr kurzer Druckausgleichszeiten gewinnen die mechanischen Folgen der Luftdruckerniedrigung an Bedeutung.

Gewebszerreißungen und Blutungen nach Dkp. werden praktisch nur in luft- oder gasgefüllten Organen beobachtet. Die sich — entsprechend der Druckminderung — expandierende Luft dehnt oder überdehnt Gewebe, wenn die Luft nicht schnell genug abströmen kann; Verletzungen der Lunge dominieren. Primäre Todesursachen nach expl. Dkp. sind: Irreversibler Atemstillstand, ausgelöst durch Erregungen, die von der Lunge zum Atemzentrum laufen und eventuell aufrechterhalten werden durch arterielle Luftembolie, und Erstickung durch massive Lungenblutungen oder akut sich entwickelndes Lungenödem. Auch eine expl. Kmp. von Unterdruck auf Normaldruck (Kolder) kann zu sofortigem Tod von Versuchstieren führen. Todesursachen sind, ähnlich wie nach expl. Dkp.: Lungenblutungen, Luftembolie und Lungenödem. Der Entstehungsmechanismus der Läsionen nach expl. Dkp. ist bekannt. Die Luft in der Lunge expandiert sich während der Luftdruckabnahme und verursacht Einrisse in Gefäßen. Der intrapulmonale Druck ist höher als der Außendruck; entsprechend dieser Druckdifferenz gelangen Luftblasen in Gefäße und bedingen — mit der Blutströmung gehend — eine arterielle Luftembolie. Ob hingegen die Lungenverletzungen nach expl. Kmp. während der Kompression oder der Expansion des Thorax, in seine Ausgangslage zurück, entstehen, ist nicht bekannt. Der intrapulmonale Druck steigt im Verlauf der Kompression und der nachfolgenden Ausdehnung nicht.

Todesursachen und autoptische Befunde nach expl. Dkp. und Kmp. sind ähnlich denen nach Luftstoßeinwirkung (blast injury), Lit. bei Zuckerman, Benzinger, Clemedson. Beim Luftstoß werden zwei Phasen von Druckänderungen wirksam: Drucksteigerung (Druckwelle) und Druckminderung (Sogwelle). Versuche mit expl. Kmp. und Dkp. gestatten die Wirkung der einzelnen Druckphasen in Abhängigkeit von Druckdifferenz und Geschwindigkeit, mit der die Druckänderung vor sich geht, abzuklären. Die Untersuchung der feinstrukturellen Veränderungen in der Lunge soll zeigen, ob ein Unterschied zwischen den makroskopisch ähnlichen Befunden nach expl. Kmp. und expl. Dkp. besteht und eventuell einen Hinweis auf den Entstehungsmechanismus der Lungenverletzungen geben.

Methodik

Die Versuchsanordnung für explosive Dekompression und Kompression wurde früher beschrieben (Kolder). Albinoratten (Durchschnittsgewicht: 150 g) wurden von Normaldruck auf Unterdruck dekomprimiert oder von Unterdruck auf Normaldruck komprimiert. Die Druckdifferenz wurde von 0,1—0,9 Atm. variiert, die Zeit, für die Druckänderung, von 1—15 msec. Tiere, die mit geringerer Druckdifferenz als 0,5 Atm. dekomprimiert bzw. komprimiert worden waren, wurden sofort nach der Druckeinwirkung mit Leuchtgas getötet. Die übrigen Tiere kamen innerhalb von Sekunden bis mehrere Stunden nach der plötzlichen Druckänderung ad exitum. Die Versuche wurden mit Tieren ohne Narkose und mit Äther- oder Kemithalnarkose (Na-Salz der Thiobarbitursäure) ausgeführt. Sofort nach dem Exitus wurde der Thorax eröffnet, die Lungen herauspräpariert und in 4%iges Formol eingelegt. Normal lufthaltige Lungen kollabieren bei der Eröffnung des Thorax, während Lungen mit starken Blutungen und Ödem ihr ursprüngliches Volumen weitgehend beibehalten. Nach Paraffineinbettung wurden 5—10 μ dicke Schnitte, zum Teil auch in kleinen Serien, angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin, nach Pasini, mit Elasticafärbung nach Weigert und teilweise mit Gitterfaserfärbung nach Rio Hortega gefärbt. Insgesamt wurden die Lungen von 59 Tieren histologisch untersucht. Die Gruppen wurden nach Letalität, entsprechend früher mitgeteilten Ergebnissen (K.), eingeteilt.

Ergebnisse

1. Dekompressionsversuche. a) Dekompressionen, die zum Tod aller Versuchstiere innerhalb 3 min führen. Das Lungengewebe erscheint vollständig von Blut überschwemmt, die alveoläre Struktur der Lunge ist kaum zu erkennen. In den blutgefüllten Arealen finden sich einzelne Luftbläschen verschiedener Größe (Abb. 1). Ihre Lokalisation entspricht dem Verlauf der Bronchuli respiratorii bzw. der Ductus alveolares (s. a. Abb. 7). Die Luftblasen werden nicht überall von der Alveolarwand begrenzt, sondern zwischen dieser und den Luftblasen liegt Blut oder Serum. Verletzungen der Alveolarwand konnten weder in der HE-Färbung, noch mit verschiedenen Spezialfärbungen in dem blutreichen Gewebe mit Sicherheit nachgewiesen werden. Unter der Pleura, auch in weniger geschädigten Abschnitten, liegt eine schmale Ödemzone, die

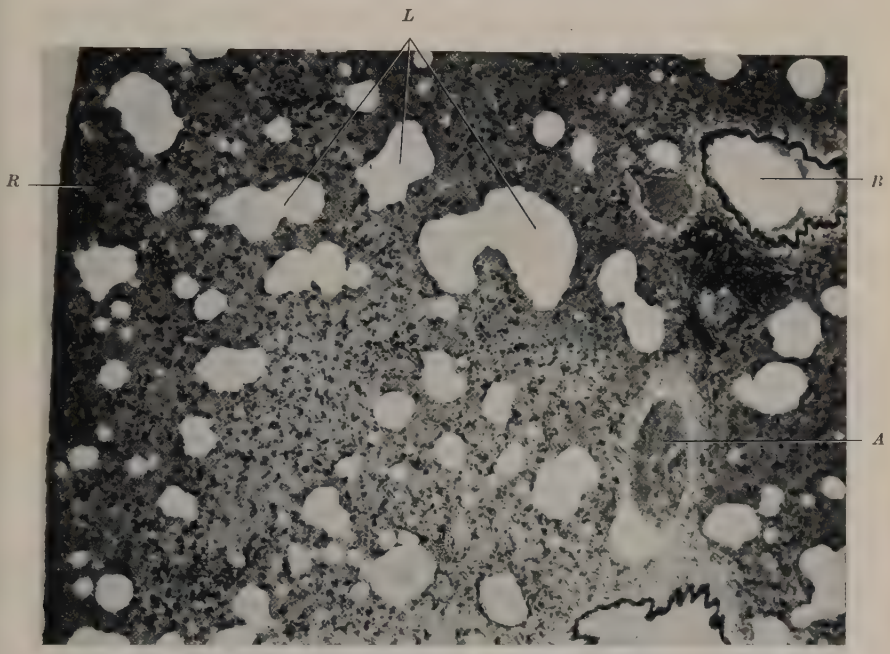


Abb. 1. Lunge nach explosiver Dekompression (1—0,1 Atm., 1 msec). Massive Blutung, *R* Randödem, *L* Luftblasen, *A* Arterien mit umgebendem Ödem, *B* Bronchulus. (Objektiv 4×, Okular 8×)

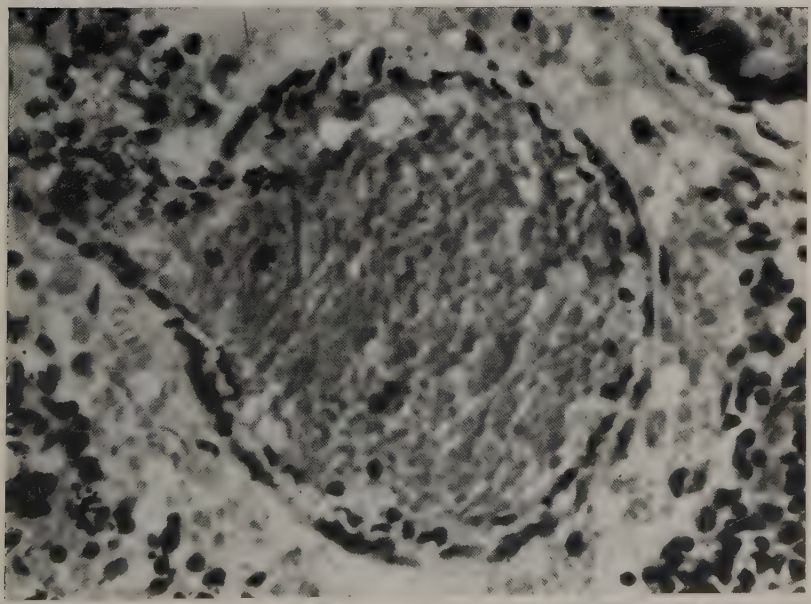


Abb. 2. Detail aus Abb. 1. Ödem und Blutung um eine kleine Arterie. (Objektiv 40×, Okular 8×)

mehr oder weniger reichlich Blutelemente enthält und im HE-Schnitt dunkler gefärbt ist als das übrige Ödem (Abb. 1). Die größeren Arterien und Bronchien sind von seröser Flüssigkeit umgeben, manchmal auch von massiven Blutungen. Die Arterien sind weit und mit Blut gefüllt (Abb. 2). Die Venen sind ebenfalls — soweit sie in den Blutungsherden überhaupt differenzierbar sind — stark mit Blut gefüllt. Kleine Venen zeigen Einrisse. Luftblasen im Lungengewebe, in den Capillaren oder größeren Gefäßen können nicht sicher nachgewiesen werden.

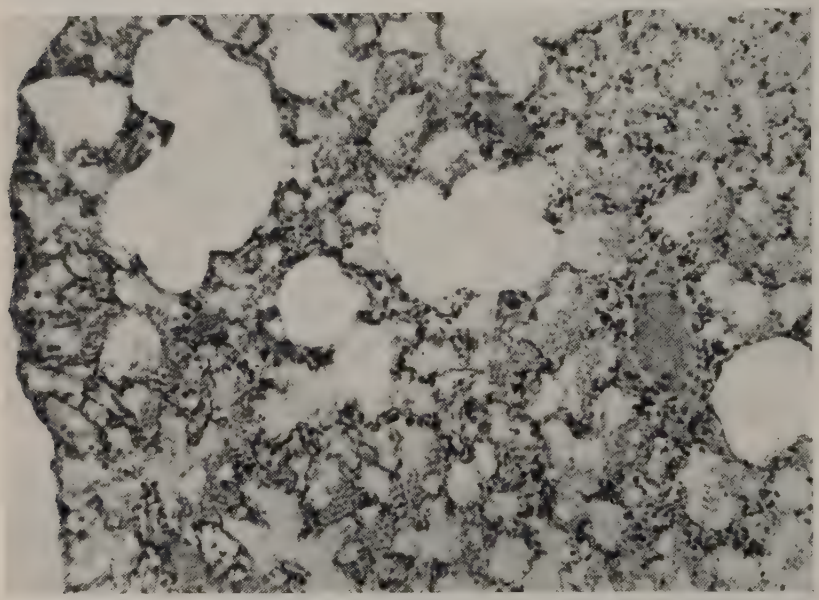


Abb. 3. Lunge nach explosiver Dekompression (0,5—0,02 Atm., 1 msec). Ausgedehntes Ödem und capillare Blutungen. (Objektiv 10×, Okular 8×)

b) Dekompressionen, die für 10—90% der Tiere letal sind. Bei Tieren, die unmittelbar nach der Dkp. ad exitum kommen, stehen Befunde, wie sie unter a beschrieben wurden, im Vordergrund. Es finden sich Blutungen wechselnden Ausmaßes, perivasculäres und Randödem, zum Teil mit Blutungen kombiniert. In normalen Abschnitten sind die Alveolen lufthältig und auffallend weit. Bei Tieren, die einige Zeit nach der Dkp. ad exitum kommen, fehlen massive Blutungen aus größeren Gefäßen. Gefäße und Bronchien sind von Ödemzonen umgeben und zahlreiche Alveolen mit Ödemflüssigkeit erfüllt, in der eine wechselnde Zahl von Erythrocyten eingelagert ist (Abb. 3).

c) Dekompressionen, die von den Tieren überlebt würden; exitus unmittelbar nach der Dekompression mit Leuchtgas. Die mikroskopischen Veränderungen sind gering und bestehen in umschriebenen

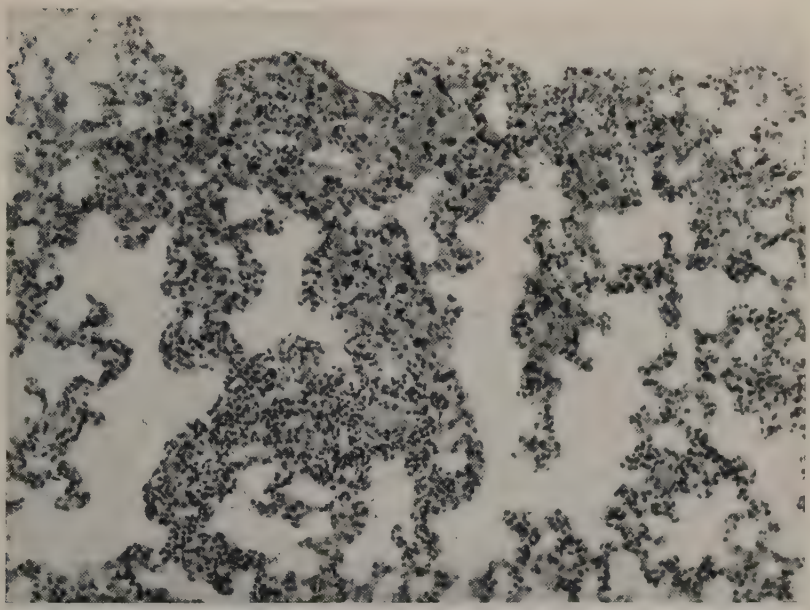


Abb. 4. Lunge nach explosiver Dekompression (1—0,5 Atm., 1 msec, Leuchtgas). Subpleurale, keilförmige Blutung. (Objektiv 10×, Okular 8×)

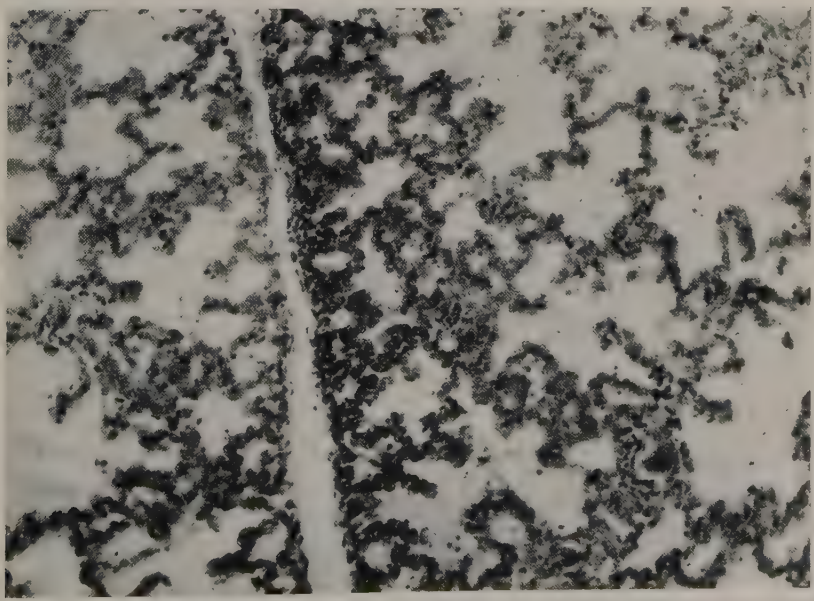


Abb. 5. Lunge nach explosiver Dekompression in Äthernarkose (1—0,1 Atm., 1 msec). Stark erweiterte Capillaren, Ödem und Blutung gering. (Objektiv 10×, Okular 8×)

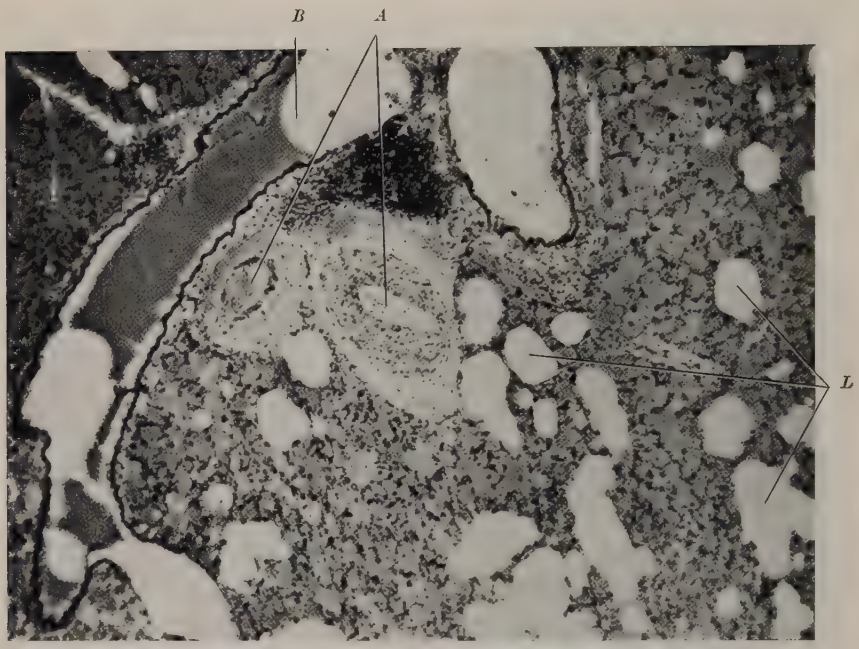


Abb. 6. Lunge nach explosiver Kompression (0,15—1 Atm., 2 msec). Massive Blutung, *L* Luftblasen, *A* Arterien mit umgebendem Ödem und Blutung, *B* Bronchulus mit blutig-schleimigem Inhalt, (Objektiv 4×, Okular 8×)

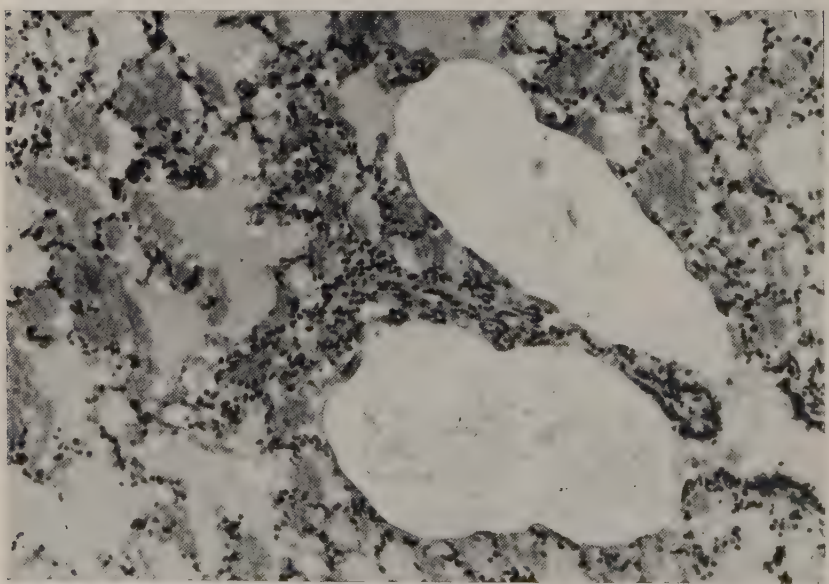


Abb. 7. Lunge nach explosiver Kompression (0,03—1 Atm., 15 msec). Lungenperipherie mit Ödem und geringer Blutung. Luftblasen, von Ödem begrenzt, im Ductus alveolaris. (Objektiv 10×, Okular 8×)

Gefäßerweiterungen und -einrissen mit kleinen Extravasaten. Die Blutungen liegen bevorzugt subpleural und zeigen teilweise keilförmige Anordnung (Abb. 4). Für das geringe Ausmaß der Veränderungen könnte, bis zu zu einem gewissen Grad, die kurze „Überlebenszeit" verantwortlich sein.

d) Dekompression von Tieren in Narkose, gleiche Druckdifferenz wie bei a. Die Letalität nach expl. Dkp. wird durch Narkose der Versuchstiere herabgesetzt, die Überlebenszeit verlängert. Die Blutungen im

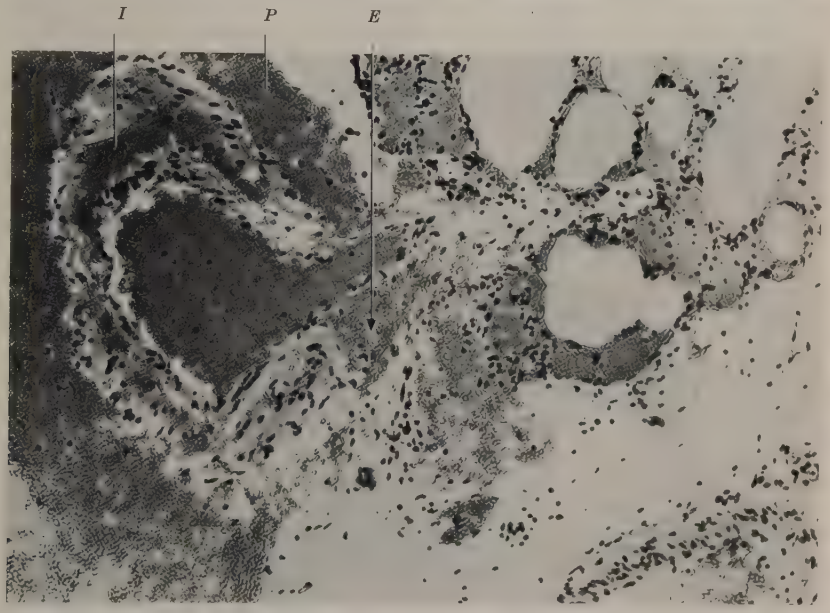


Abb. 8. Lunge nach explosiver Kompression (0,15—1 Atm., 2 msec) Vene mit Einriß (*E*) und intramuraler (*I*) und perivasculärer (*P*) Blutung. (Objektiv 10×, Okular 8×)

Lungengewebe sind geringer als bei Gruppe a, doch finden sich auch hier perivasculäre Blutungen und Ödeme. Besonders auffällig sind prall mit Blut gefüllte und erweiterte Capillaren. Die Alveolen weisen trotz starker Füllung mit Ödemflüssigkeit keine oder nur geringe Blutungen auf (Abb. 5).

II. Kompressionsversuche. a) Kompressionen, die zum Tod aller Versuchstiere innerhalb 3 min führen. Der Großteil des Lungengewebes ist von ausgedehnten, massiven Blutungen durchsetzt (Abb. 6). Eingelagerte Luftblasen zeigen dieselben Beziehungen zu den Bronchuli, wie sie bei Dekompressionen beschrieben wurden (Abb. 7). Neben Blutungsbezirken finden sich lufthaltige Abschnitte mit erweiterten, stark blutgefüllten Capillaren und Venen. Die Arterien sind eher kontrahiert und eng (Abb. 6). Blutungen um Gefäße und Bronchien sind häufig.

Größere Venen zeigen Einrisse und Blutungen zerschichten teilweise die Venenwand (Abb. 8). Die Bronchien enthalten Blut und blutig durchsetzten Schleim.

b) Kompressionen, die für 10—90% der Tiere letal sind. In dieser Gruppe überwiegt die Ödembildung in den Alveolen, perivasculär und peribronchial; teilweise ist die Ödemflüssigkeit von Erythrocyten durchsetzt (Abb. 9). Erweiterte, stark mit Blut gefüllte Capillaren und herdförmige Blutungen sind häufig zu beobachten, während eine intensivere

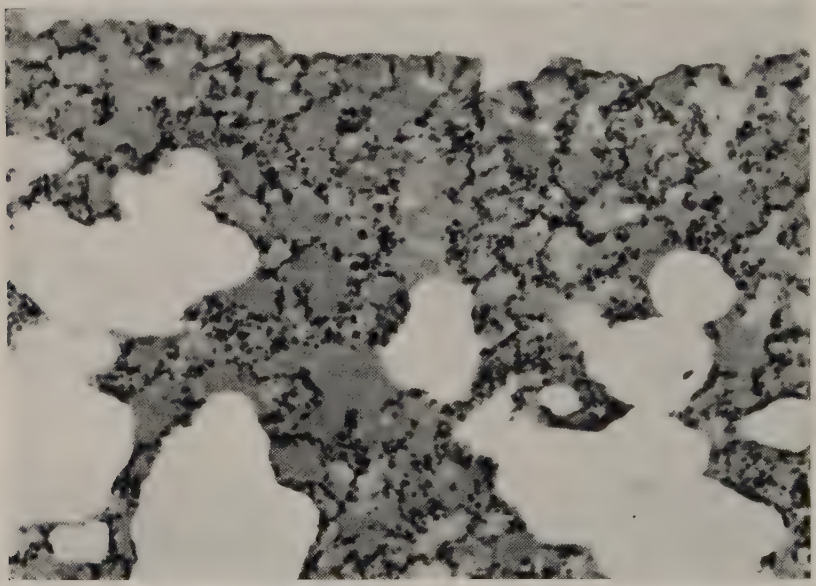


Abb. 9. Lunge nach explosiver Kompression (0,2—1 Atm., 9 msec). Regionäres Ödem mit geringer Blutung. (Objektiv 10×, Okular 8×)

Färbung des subpleuralen Ödems, wie bei Lungen nach Dkp., nur vereinzelt, an umschriebenen Stellen, gesehen wird. In weniger geschädigten Lungenabschnitten sind die Alveolen weit und lufthältig.

c) Kompressionen, die von den Tieren überlebt würden; exitus unmittelbar nach der Kompression mit Leuchtgas. Bei diesen Tieren werden nur lokal begrenzte, capillare Gefäßerweiterungen mit kleinen Blutungen, bevorzugt in oberflächennahen Abschnitten, gefunden. Die sofortige Tötung nach der Kmp. ist wahrscheinlich auch bei diesen Versuchen für die geringen Veränderungen verantwortlich.

Diskussion

Die mikroskopischen Befunde in Lungen nach explosiver Dekompression und explosiver Kompression variieren innerhalb der einzelnen Lungen und bei Tieren, die derselben Druckänderung unterworfen

werden. Sowohl nach Dkp. als auch nach Kmp. sind die auffallendsten Veränderungen um größere Gefäße und Bronchien lokalisiert. Bei Tieren, die bald nach der Druckänderung ad exitum kommen, dominieren massive Blutungen um Arterien, Venen und Bronchien, die Alveolen sind mit Blut gefüllt. Verletzungen der Alveolarwand können, wegen der starken Blutungen, nicht sicher beurteilt werden. Tiere, die einige Zeit überleben, zeigen keine massiven Blutungen, aber um größere Gefäße und Bronchien und in den Alveolen ausgedehnte Ödembildung. Eine starke Füllung periarterieller Lymphräume (v. HAYEK) könnte eventuell ein periarterielles Ödem vortäuschen. Die hier beschriebenen Ödeme sind jedoch nicht von einer Lymphgefäßwand begrenzt, sondern liegen frei in Gewebsspalten. Auch für die Erklärung der Ödeme um Venen und Bronchien reichen die, in diesem Bereich spärlichen und kleinen Lymphgefäße nicht aus.

Für Verletzungen nach Luftstoß wurde von RÖSSLE, CLEMEDSON und anderen als Prädilektionsstelle ebenfalls der Übergang von Lungengewebe zum Bronchial- oder Gefäßbaum angegeben. Unter der Einwirkung einer Druckwelle (Schockwelle) sollen „Gewebe mit unterschiedlicher Masse verschieden stark beschleunigt werden" und dadurch Verletzungen bedingen. In den hier mitgeteilten Versuchen kann aber nur eine Expansion oder Kompression der Luft in der Lunge wirksam werden, wenn von kleinen Druckschwankungen im Verlauf der Druckänderung abgesehen wird. Die Lokalisation des Ödems um Gefäße und Bronchien weist auf die starke mechanische Beanspruchung an diesen Stellen hin, wie sie in lufthaltigen Geweben durch plötzliche Volumenänderungen verursacht wird. Solche Volumenänderungen wirken, nach HARVEY und Mitarb., auch im Unterwasserblast zerstörend. Die Entwicklung des Ödems kann durch lokales Eindringen von Luftblasen gefördert werden. Wenn keine sicheren Angaben über Luftblasen im Lungengewebe oder in Gefäßen, aus den untersuchten Schnitten, gemacht werden, obwohl z. B. in Abb. 2 und 6 kleinste Vacuolen zu sehen sind, so deshalb, weil solche Veränderungen auch in normalen Lungen gefunden werden (W. SCHUBERT) und als Artefakte in Erscheinung treten können. Für das Entstehen der arteriellen Luftembolie nach Dkp. und auch nach Kmp. sind die zahlreichen Einrisse in größeren Venen wahrscheinlich bedeutungsvoller als capilläre Zerreißungen.

Tiere in Narkose zeigen geringere Blutungen in der Lunge als unnarkotisierte Tiere, überleben auch in einem höheren Prozentsatz. Das histologische Bild, mit stark erweiterten Capillaren und Venen, ähnelt dem einer Stauungslunge. Vagotomierte Tiere ertragen die Dkp. ebenfalls besser als normale Tiere und zeigen geringere Blutungen und Ödeme in der Lunge. Neben der direkten, mechanischen Wirkung einer Druckänderung auf die Lunge dürften daher auch andere Faktoren Bedeutung

haben, etwa im Sinne von Gamble u. Patton, die Verletzungen im Hypothalamus oder Kontusion des Schädels als Ursachen für die Ausbildung eines Lungenödems bei Ratten angeben.

Die keilförmigen, subpleuralen, makroskopisch streifenförmigen Blutungen in der Lunge könnten auf ungleiche Änderung des Lungenvolumens im Rippen- und Zwischenrippenbereich zurückgehen. Clemedson und Granström haben ähnliche Veränderungen nach Luftstoß beobachtet und dem Intercostalraum zugeordnet. Auch bei chronischer Überdehnung der Lunge weisen pathologische Befunde darauf hin, daß die Lunge zwischen den Rippen stärker gedehnt wird als unter den Rippen (Löschke).

Aus der mikroskopischen Beurteilung ist eine sichere Unterscheidung zwischen der Wirkung einer Luftexpansion und Luftkompression in der Lunge nicht möglich. Gewisse Anhaltspunkte ergeben sich aus dem Randödem und der Weite der Arterien. Das Randödem kommt bei allen Dekompressionslungen gleich und regelmäßig zur Ausbildung, Kompressionslungen sind dagegen nur gelegentlich, stellenweise, ähnlich verändert. Das Randödem kann, entsprechend der Vorstellung von Hitchcock, mechanisch, durch „Anprall" der sich expandierenden Lunge an der Thoraxwand, entstehen. Ob die Lunge bei expl. Kmp. während der Kompression oder der Expansion verletzt wird, kann nicht entschieden werden.

Zusammenfassung

Es wird über die histologischen Veränderungen in Lungen von Ratten, nach explosiver Dekompression und explosiver Kompression, berichtet. Bei Tieren, die unmittelbar nach der Druckänderung ad exitum kommen, stehen massive Blutungen perivasculär und peribronchial, sowie in den Alveolen im Vordergrund. Die Venen sind häufig eingerissen. Wird die Druckänderung einige Zeit überlebt, so bildet sich ein ausgedehntes Lungenödem. Größere Gefäße und Bronchien sind von seröser Flüssigkeit umgeben. Die mikroskopischen Befunde bei Dekompression und Kompression sind einander sehr ähnlich. Eine gewisse Unterscheidung ist durch das schmale, subpleurale Randödem nach Dekompression möglich. Die arterielle Luftembolie nach Dekompression und Kompression kann durch zahlreiche Einrisse in den Lungenvenen zustandekommen.

Literatur

Benzinger, Th.: Explosive Decompression. German Aviat. Med. WW II. Washington: Printing Office 1950. — Clemedson, C.-J.: An experimental study on air blast injuries. Acta physiol. scand. (Stockh.) **18**, Suppl. 61 (1949). — Clemedson, C.-J., and S. A. Granström: Studies on the genesis of "rib markings" in lung blast injury. Acta physiol. scand. (Stockh.) **21**, 131—144 (1950). — Gamble, J. E., and H. D. Patton: Pulmonary edema and hemorrhage induced by hypothalamic

lesions in rats. Science (Lancaster, Pa.) **113**, 626—628 (1951). — Grognot, P., et R. Senelar: De quelques considérations sur les lésions anatomo-pathologiques produites par des décompressons explosives au niveau du poumon de cobaye. Aeromedica Acta, Special Edition 1957, 129—146. — Hall, A. L.: Some effects of explosive decompression on albino rats: Preliminary studies. US Naval School of Aviat. Med., Pensacola, Proj. No. NM 001 101 105.01 (1955). — Harvey, E. N., I. M. Korr, G. Oster and J. H. McMillen: Secondary damage in wounding due to pressure changes accompaning the passage of high velocity missiles. Surgery (St. Louis) **21**, 218—239 (1947). — v. Hayek, H.: Die menschliche Lunge. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1953. — Hitchcock, F. A.: Physiological and pathological effects of explosive decompression. J. Aviation Med. **25**, 578—586 (1954). — Kolder, Hj.: Explosive Dekompression auf Unterdruck. Die Folgen der Abnahme des Luftdruckes in kürzester Zeit. Sitzgsber. Akad. Wiss., Wien, Abt. 2, **165**, 357—419 (1956). — Explosive Kompression. Plötzliche Erhöhung des Luftdruckes von Unterdruck auf Normaldruck. Pflügers Arch. **264**, 441—455 (1957). — Löschke, H.: Störungen des Luftgehaltes. Handbuch der spez. path. Anatomie und Histologie, Bd. 3/1 S. 638f. Berlin: Springer 1928. — Rössle, R.: Pathology of blast effects. German Aviat. Med. WW II. Washington: Printing Office 1950. — Schubert, W.: Experimentelle Untersuchungen über erhöhten Gasgehalt im Organgewebe, zugleich ein morphologisch-pathologischer Beitrag zur Luftembolie und Drucksturzkrankheit. Virchows Arch. **324**, 563—587 (1954). — Violette, F.: Les effets physiologiques des décompressions explosives et leur mécanisme. Méd. Aéronaut. **9**, 223—271 (1954). — Zuckerman, S.: Discussion on the problem of blast injuries. Proc. Roy. Soc. Med. **34**, 171—192 (1941).

Dr. Hj. Kolder, Wien IX, Schwarzspanierstr. 17, Österreich

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 34—54 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens)

Der Harmin-Tremor und seine Antagonisten

Von
G. Zetler

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Februar 1957)

Zu diesen Versuchen wurden wir angeregt durch unsere Beobachtung, daß Substanz P den Harmin-Tremor abschwächt (Zetler 1956 a, b); als wir diesen Befund deuten wollten, fanden wir nämlich nur eine einzige Arbeit, in der die Wirkung weniger Pharmaka auf den Harmin-Tremor beschrieben wird (Hara u. Kawamori 1954). Dies ist erstaunlich, weil einmal der Harmin-Tremor schon seit Neuner u. Tappeiner (1895) bekannt ist, und weil andererseits seit den Arbeiten von Beer (1939 a, b), Hara (1953) u. Kawamori (1954) der Harmin-Tremor auf eine Beeinflussung des extrapyramidalen Systems durch dieses Alkaloid zurückgeführt werden muß.

Obwohl der Harmin-Tremor ein sehr eindrucksvolles Phänomen ist, das bei der Maus nach der subcutanen Injektion von 7 mg/kg des Harminhydrochlorids etwa 30 min andauert, galt in den letzten Jahren das Interesse zahlreicher Pharmakologen dem nur sehr kurz dauernden Nicotin-Tremor (Bovet u. Longo 1951, Dahlbom, Edlund, Ekstrand u. Katz 1952, Reuse 1952, Cahen, Thomas u. Tvede 1953). Dieses Interesse hat nicht nur theoretische sondern auch praktische Gründe, da viele Parkinson-Mittel den Nicotin-Tremor verhindern und auf diese Weise geprüft werden können. Trotzdem besteht bekanntlich keine zuverlässige Beziehung zwischen der Wirksamkeit eines Pharmakons gegen den Nicotin-Tremor und seiner klinischen Nützlichkeit als Parkinson-Mittel.

Es ist nicht bekannt, ob der Harmin-Tremor für Parkinson-Mittel besonders empfindlich ist und sich für die Untersuchung solcher Medikamente vielleicht besser eignet als der Nicotin-Tremor. Kürzlich hat Everett (1956) beschrieben, daß 1,4-Dipyrrolidino-2-butyn („Tremorine") einen Tremor hervorruft, der dem Parkinson-Tremor pharmakologisch sehr ähnlich ist (Everett, Blockus u. Shepperd 1956, Everett, Blockus, Shepperd u. Toman, 1956). Diese Autoren haben betont, daß nur sehr wenige Substanzen bekannt sind, die in nichttoxischen Dosen anhaltenden Tremor hervorrufen. Aus allen diesen Gründen schien es uns wünschenswert, mehr über die pharmakologischen Eigenschaften des Harmin-Tremors zu erfahren.

Material und Methodik

Bei den Tremor-Versuchen waren die Versuchstiere männliche Mäuse im Gewicht von 30—37 g. Diese Tiere entstammten dem reinen Inzucht-Stamm unseres Instituts und waren am Ende des ersten Lebensmonats 16 g und nach dem zweiten Monat 28 g schwer; unsere Versuchstiere waren also 2,5—3,5 Monate alt. Die Mäuse wurden mehrmals in den Versuch genommen; zwischen zwei Versuchen lagen mindestens 6 Tage, wodurch die Entstehung der schon von Flury (1911) beobachteten Toleranz gegen Harmin verhindert wurde. Alle injizierten Substanzen wurden — von wenigen Ausnahmen abgesehen — in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst. Harmin wurde subcutan, die anderen Substanzen wurden gleichzeitig intraperitoneal injiziert. Das Volumen der injizierten Flüssigkeit war konstant und betrug subcutan und intraperitoneal je 0,01 ml/g Körpergewicht.

Zur Registrierung des Tremors benutzten wir die früher beschriebene Apparatur (Zetler 1956a) in ihrer modifizierten Form (Zetler 1956b). Hier müssen wir auf einen Mangel unserer Vorrichtung hinweisen, der darin besteht, daß auch grobe Spontanbewegungen registriert werden. Dies hatte bei unseren früheren Versuchen nur eine sehr geringe Rolle gespielt, da die Tiere bei Anwendung von Harmin allein oder nach Vorbehandlung mit Substanz P ruhig saßen und grobe Spontanbewegungen selten waren. Bei unseren jetzigen Versuchen wirkten eine Reihe von Substanzen erregend auf die Tiere, wodurch grobe Spontanbewegungen auftraten, die die Registrierung des Tremors störten. Diese Schwierigkeit ist aber leicht zu überwinden, wenn man während des Versuches das Kästchen und den Arbeitssammler beobachtet und die auf Spontanbewegungen beruhenden Kontakte eliminiert. — Bei den Versuchen betrug die Raumtemperatur 22—23° C. Die Körpertemperatur wurde bei den Mäusen mit einem 20 mm tief in das Rectum eingeführten Thermoelement gemessen. Bei entsprechenden Versuchen an Wistar-Ratten führten wir das Thermoelement 70 mm tief durch das Rectum ein.

Die ED_{50} berechneten wir nach Behrens u. Schlosser (1957); auch hier danke ich Frl. Dr. Lucie Schlosser für die Durchführung dieser Berechnungen. Die in Tab. 3 und den Abb. 1, 2 u. 3 verwerteten Mittelwerte und ihre mittleren Fehler — mit Ausnahme der mittleren Differenzen und ihrer mittleren intraindividuellen Fehler — berechneten wir nach Gaddum (1953). Die Mittelwerte wurden mittels der t-Verteilung miteinander verglichen. Wir nahmen an, daß kein echter Unterschied zwischen zwei Mittelwerten besteht, wenn $p > 0{,}05$ ist.

Bei der Benennung der von uns angewandten Substanzen benutzten wir nach Möglichkeit die international gebräuchlichen, ungeschützten Namen und richteten uns dabei nach der Liste von Marler (1956); die in Deutschland üblichen Namen sind in Tab. 2 mit angegeben.

Für die freundliche Überlassung von Substanzen danken wir folgenden Herren: Dr. A. Cerletti/Basel (Lysergsäurediäthylamid, 2-Brom-lysergsäurediäthylamid), Prof. Dr. V. Erspamer/Parma (5-Oxytryptamin-kreatininphosphat), Dr. L. Holzinger/Wien (Myocain), Doz. Dr. R. Hotovy/Darmstadt (Harmin, Bulbocapnin, Belladonnin), Dr. E. Jacobsen/Kopenhagen (Benactyzine, Rigidyl), Doz. Dr. R. Kopf/Kopenhagen (Diphenhydramin, Covatin, N 71, N 90, N 91), Prof. Dr. W. Th. Nauta/Amsterdam (Disipal, Brocades XCIXa), Dr. H. Reinert/Greenford (5-Benzyloxygramin), Dr. D. W. Woolley/New York (Medamin); ferner folgenden Firmen: Bayer/Leverkusen (Äthopropazin, Chlorpromazin, Diäthazin, Promethazin, Thiazinamium), Byk-Gulden/Konstanz (Mephenesin), Ciba/Wehr (Reserpin, Adiphenin), Knoll/Ludwigshafen (Akineton, Soventol, Scopolamin), Lederle/München (Benzhexol, Meprobamat), Eli Lilly/Indianapolis (Cycrimine), Nordmark/Uetersen (Phenytoin), Sandoz/Nürnberg, Hydergin), Thomae/Biberach (Caramiphen).

Ergebnisse

Harmin-Hydrochlorid erzeugte in einer subcutanen Dosis von 7 mg/kg bei unseren Mäusen regelmäßig Tremor; mit Harmin-Dosen ähnlicher Größenordnung hatten auch Hara u. Kawamori (1954) gearbeitet. Die Abb. 1 stellt den zeitlichen Verlauf des Tremors dar, der schon wenige Minuten nach der Injektion beginnt, nach 10—15 min sein Maximum erreicht und in den darauffolgenden 20 min langsam abklingt. Dieser Tremor ist grob, er wird durch Intention verstärkt. Wir untersuchten nun, ob es günstig ist, den Tremor nur von der 8. bis zur 16. min nach der Injektion zu registrieren, also zu einer Zeit, wo jedes Tier mit Sicherheit einen deutlichen Tremor zeigt. Die so erhaltenen Werte streuen erheblich (Tab. 1). Bei einem Mittelwert von 78 Kontakten war der kleinste beobachtete Wert 37, also noch größer als der Mittelwert bei 8 min in Abb. 1. Um „Alles-oder-Nichts"-Aussagen zu erhalten, setzten wir willkürlich fest, daß ein Tier dann gegen die Tremor erzeugende Wirkung von Harmin als „geschützt" gelten sollte, wenn in der Zeit von der 8. bis zur 16. min nach der Harmin-Injektion nur 25 oder weniger Kontakte registriert wurden.

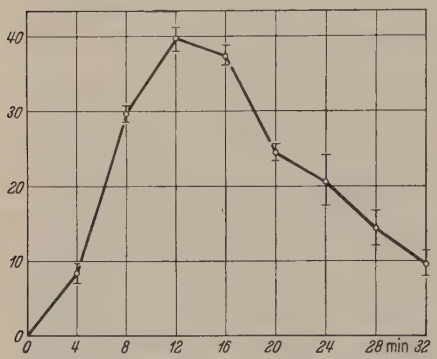


Abb. 1. Verlauf des Tremors der Maus ($n = 20$) nach der subcutanen Injektion von 7 mg/kg Harmin-Hydrochlorid in 0,01 ml/g 0,9%iger NaCl-Lösung, wenn gleichzeitig intraperitoneal 0,01 ml/g NaCl-Lösung gegeben wurde. Abszisse: Zeit nach der Injektion in Minuten; Ordinate: Stärke des Tremors, ausgedrückt durch die Anzahl von Signalen, die der Arbeitssammler innerhalb von je 4 min gab

Tabelle 1. *Anzahl der vom Arbeitssammler von der 8. bis zur 16. min nach der Injektion von 7 mg/kg Harmin (subcutan) und von 0,01 ml/g NaCl-Lösung (intraperitoneal) registrierten Kontakte ($n = 20$)*

205	41	112	123	66
37	49	53	45	58
65	73	141	122	93
51	124	71	142	72

Mittelwert	77,7
Grenzen des mittleren Fehlers des Mittelwertes	69,7—86,6
Vertrauensgrenzen für $p = 0{,}05$	61,9—97,5

Eine Rechtfertigung dieser Grenzsetzung scheint uns aus Abb. 2 hervorzugehen, in der wir die Wirkung von 3 Antagonisten näher dargestellt haben. Man sieht, daß niedrige Dosen der Antagonisten, die erst 20—30% der Tiere gegen den Tremor schützen, die mittlere Anzahl der Kontakte

und damit etwa die mittlere Intensität des Tremors bereits um mindestens 50% verringern. Bei weiterer Erhöhung der Dosen der Antagonisten zeigen die „Alles-oder-Nichts"-Beobachtungen eine befriedigende Abhängigkeit von der Dosis. Dagegen ist bei den gemessenen Werten (Kurve *A*) der Effekt der jeweils niedrigsten Dosis im Vergleich zu den Wirkungen der folgenden höheren Dosen zu groß. Die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung verläuft bei den „Alles-oder-Nichts"-Beobachtungen

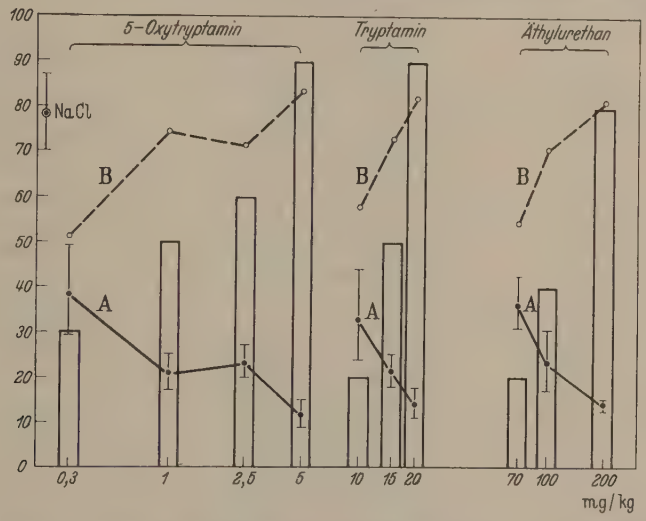


Abb. 2. Einfluß der intraperitonealen Injektion verschiedener Dosen von 5-Oxytryptamin, Tryptamin und Äthylurethan auf den Tremor nach 7 mg/kg Harmin (gleichzeitig subcutan injiziert). NaCl = Kontroll-Wert (vgl. Tab. 1). Abszisse (logarithmisch): Dosen der Antagonisten (je 10 Tiere) in mg/kg. Ordinate: Mittlere Anzahl der vom Arbeitssammler zwischen der 8. und der 16. min gegebenen Signale (Kurve *A*; eingezeichnet sind die mittleren Fehler der Mittelwerte. Alle Punkte unterscheiden sich signifikant vom Kontroll-Wert); oder: Prozentuale Abnahme der mittleren Anzahl der Kontakte (Kurve *B*); oder: Prozentsatz der gegen den Tremor „geschützten" Tiere (Kolumnen)

viel steiler als bei den gemessenen Werten. Wir hielten es deshalb für richtig, für die einzelnen zu untersuchenden Substanzen die Beziehung zwischen der Dosis und der Anzahl der Tiere zu bestimmen, die nach obiger Definition gegen den Tremor „geschützt" waren. Wir wollten für jeden Stoff die Dosis finden, die 50% der Tiere gegen den Harmin-Tremor schützt (ED_{50}). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 2 dargestellt.

Everett (1956) hatte gefunden, daß die Tremor erzeugende Substanz Tremorine bei Mäusen außer Tremor auch Salivation, Diarrhoe und vor allem eine erhebliche Senkung der Körpertemperatur hervorruft; die Parkinson-Mittel beseitigten nicht nur den Tremor, sondern alle Tremorine-Wirkungen. Auch von Harmin war bekannt, daß es (bei Ratten) die Körpertemperatur senkt (Marcović u. Giaja 1951). Wir wollten deshalb

Tabelle 2. *Die Wirksamkeit einiger Pharmaka gegen den Harmin-Tremor der Maus*

Pharmakon	Dosis mg/kg i.p.	n geschützt / n insgesamt	ED_{50} mg/kg i.p.	Vertrauensgrenze für $p = 0{,}05$
Bulbocapnin	4,7	3/10	7,0	5,39—9,09
	7,0	5/10		
	10,5	7/10		
Apomorphin	0,6	3/10	1,8	0,91—3,68
	1,25	5/10		
	2,5	6/10		
	5,0	7/10		
Atropin	20,0	2/10	28,3	23,14—34,59
	28,3	5/10		
	40,0	8/10		
Scopolamin	10,0	2/10	16,4	12,38—21,83
	15,0	4/10		
	20,0	6/10		
Belladonnin	7,0	1/10	26,7	14,54—48,86
	23,6	5/10		
	79,5	8/10		
Benzhexol (Artane)	5,0	1/10	12,3	8,80—17,23
	10,0	3/10		
	20,0	8/10		
Caramiphen (Parpanit)	10,0	2/10	14,9	11,93—18,6
	15,0	5/10		
	20,0	7/10		
Cycrimin	10,0	2/10	15,5	9,91—24,3
	15,0	4/10		
	20,0	6/10		
Akineton	7,0	4/10	10,3	6,4 —16,7
	10,5	5/10		
	15,75	6/10		
	23,6	7/10		
Soventol	10,0	3/10	14,3	11,3 —18,12
	15,0	5/10		
	20,0	7/10		
Adiphenin (Trasentin)	20,0	3/10	23,1	19,21—27,88
	25,0	5/10		
	30,0	7/10		
Diphenhydramin (Benadryl)	6,25	2/10	12,7	8,8 —18,18
	10,0	4/10		
	16,0	6/10		

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Pharmakon	Dosis mg/kg i.p.	*n* geschützt / *n* insgesamt	ED_{50} mg/kg i.p.	Vertrauensgrenze für $p = 0{,}05$
Rigidyl	10,0	2/10	20,0[1]	
	20,0	5/10		
Disipal	5,0	2/10	11,5	7,62—17,32
	10,0	4/10		
	20,0	7/10		
Brocades XCIXa	10,0	0/7	26,4	19,2 —36,25
	20,0	3/10		
	40,0	8/10		
Benactyzin	10,0	3/10		
	20,0	3/10		
Covatin	5,0	1/10	11,5	8,15—16,19
	10,0	4/10		
	20,0	8/10		
N 91 (s. Tab. 6)	5,0	2/10	10,1	7,45—16,15
	10,0	4/10		
	20,0	9/10		
N 71 (s. Tab. 6)	10,0	1/10	21,4	14,57—31,55
	20,0	5/10		
	40,0	8/10		
N 90 (s. Tab. 6)	2,5	3/10	5,0	2,84— 8,81
	5,0	5/10		
	10,0	7/10		
Mephenesin (Myanesin)	12,0	1/10	32,9	22,23—48,63
	30,0	4/10		
	75,0	9/10		
Myocain	14,0	2/10	34,2	24,4 —48,0
	21,0	4/10		
	31,5	4/10		
	47,0	6/10		
	71,0	8/10		
Meprobamat (Miltown)	20,0	0/10		
Chlorpromazin (Megaphen)	0,3	2/10	1,2	0,51— 2,87
	1,0	5/10		
	10,0	9/10		
Promethazin (Atosil)	0,3	3/10	1,23	0,45— 3,39
	1,25	5/10		
	5,0	7/10		
	10,0	8/10		

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Pharmakon	Dosis mg/kg i.p.	n geschützt / n insgesamt	ED_{50} mg/kg i.p.	Vertrauensgrenze für $p = 0{,}05$
Thiazinamium (Padisal)	2,5 5,0 10,0	2/10 4/10 7/10	5,7	3,81— 8,66
Äthopropazin (Dibutil)	1,75 3,5 7,0 14,0 28,0	3/10 4/10 5/10 6/10 8/10	6,5	3,65—11,69
Diäthazin (Latibon)	10,0 20,0 40,0	2/10 4/10 7/10	23,0	15,24—34,67
Phenytoin (Diphenylhydantoin)	5,0 10,0	3/10 6/10	8,0[1]	
Hydergin	6,0 12,9	3/10 6/10	9,6[1]	
Lysergsäurediäthylamid (LSD)	0,25 0,375 0,5 (0,8	2/10 4/10 6/10 4/8)	0,423	0,32— 0,55
2-Brom-lysergsäurediäthylamid (BOL 148)	2,5 5,0 10,0	2/10 5/12 7/10	5,7	3,74— 8,59
Serotonin[2] (5-Oxytryptamin-Kreatininsulfat)	0,3 1,0 2,5 5,0	3/10 5/10 6/10 9/10	0,97	0,488—1,944
Medmain	5,0 7,5 10,0	2/10 4/10 7/10	7,5	5,85— 9,61
5-Benzyloxygramin	5,0 10,0 20,0	2/10 4/10 7/10	11,5	7,61—17,33
Tryptamin	10,0 15,0 20,0	2/10 5/10 9/10	13,8	11,3 —16,8
L(—)-Tryptophan	20,0 40,0 (60,0	3/10 6/10 1/6)	32,0[1]	

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Pharmakon	Dosis mg/kg i.p.	*n* geschützt / *n* insgesamt	ED_{50} mg/kg i.p.	Vertrauensgrenze für $p = 0{,}05$
Indol	15,0	2/10	21,1	16,82—26,55
	22,5	5/10		
	30,0	7/10		
Reserpin	1,0	3/10	3,2	1,53— 6,71
	3,16	6/10		
	10,0	7/10		
	31,6	9/10		
Urethan	70,0	2/10	116,2	86,64—155,7
	100,0	4/10		
	200,0	8/10		
Chloralhydrat	100,0	3/10	151,6	79,4 —189,4
	200,0	6/10		

[1] Eine weitere Erhöhung der Dosen wirkte erregend, wodurch die Anti-Harmin-Wirkung wieder geringer wurde. Bei Phenytoin, Hydergin und Tryptophan wurde die ED_{50} zeichnerisch gefunden (Wahrscheinlichkeitspapier).

[2] Die Dosierung bezieht sich auf einen Basen-Gehalt von 46%!

untersuchen, ob bei Harmin ebenso wie bei Tremorine zugleich mit dem Tremor auch die Temperatursenkung durch geeignete Mittel beseitigt wird.

Wir fanden jedoch zunächst, daß die Körpertemperatur der Mäuse nach Harmin stark ansteigt (Abb. 3) und nicht sinkt, wie wir es eigentlich erwartet hatten. Dies ist nicht etwa auf eine störende Verunreinigung in unserem Harmin-Präparat zurückzuführen; die Firma Merck/Darmstadt teilte uns auf unsere Nachfrage mit, daß es sich um eine sehr reine Substanz handelt (papierchromatographisch geprüft). Besonders auffallend ist die große Schnelligkeit, mit der die Temperatur nach Harmin ansteigt. Bei unseren 150—170 g schweren Ratten senkte Harmin die Körpertemperatur (Abb. 3), womit wir diese Beobachtung von Marković u. Giaja (1951) bestätigen. Der Harmin-Tremor zeigte sich bei den Ratten etwa von der 10. bis zur 20. min nach der Injektion, er war jedoch nicht so stark wie bei den Mäusen.

In Tab. 3 ist dargestellt, wie einige gegen den Harmin-Tremor wirksame Substanzen die Harmin-Hyperthermie beeinflussen. In den meisten Fällen ist schon bei Dosen, die erst 20—30% der Tiere vor dem Tremor schützen, die Körpertemperatur nicht mehr erhöht. Bei einigen Substanzen (5-Benzyloxygramin, Tryptamin, Cycrimin) ist bei dieser Dosierung die Temperatur noch erhöht, bei Steigerung der Dosis wird die Temperatur normal oder sie sinkt sogar unter die Norm ab (5-Benzyloxygramin, Cycrimin). Bei höheren Dosen der Antagonisten findet sich

eine solche Senkung der Körpertemperatur nicht selten (Indol, Medmain, Hydergin, Cycrimin, 5-Benzyloxygramin). Von besonderer Wichtigkeit scheinen uns die folgenden Beobachtungen zu sein: 1. Die Körpertemperatur kann unter die Norm gesenkt sein bei weitgehend erhaltenem Tremor (BOL 148); 2. eine Hyperthermie kann auch bei stark vermindertem Tremor vorkommen (Phenytoin, LSD).

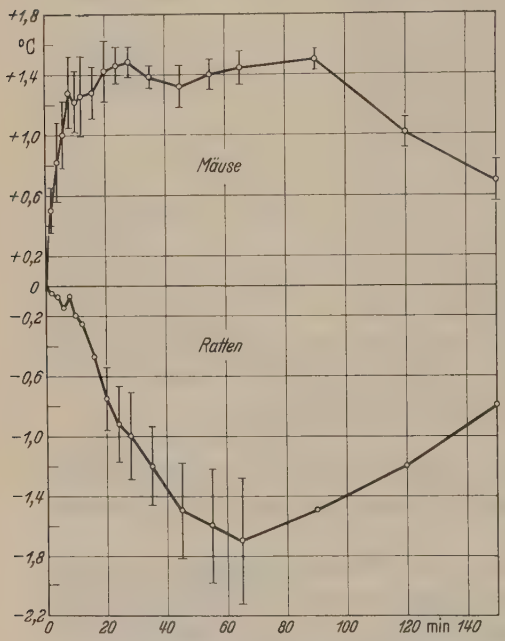


Abb. 3. Verhalten der Körpertemperatur bei 4 männlichen Wistar-Ratten und 5 männlichen Mäusen nach der subcutanen Injektion von 7 mg/kg Harmin und gleichzeitiger intraperitonealer Gabe von 0,01 ml/g NaCl-Lösung (0,9%). Die Punkte der Kurven sind die Mittleren Differenzen der Körpertemperatur mit den Mittleren intra-individuellen Fehlern; wo letztere nicht eingezeichnet sind, war die Temperatur-Differenz nicht signifikant ($p > 0{,}05$). Abszisse: Zeit nach der Injektion in Minuten; Ordinate: Zu- oder Abnahme der Körpertemperatur in ° C

Diskussion

Bisher haben nur Hara u. Kawamori (1954) untersucht, ob sich der Harmin-Tremor mit pharmakologischen Mitteln hemmen läßt; sie fanden, daß dies mit Bulbocapnin, Phenytoin, Mephenesin, Urethan, Amidon und Barbituraten möglich ist. Soweit wir die gleichen Substanzen untersucht haben, bestätigen wir diese Autoren; auch wir fanden Phenytoin und Bulbocapnin besonders stark wirksam. Von diesen beiden Substanzen gaben obige Autoren 10 mg/kg, was etwas mehr als unsere jeweilige ED_{50} ist. Leider haben Hara u. Kawamori keine genaueren quantitativen Untersuchungen durchgeführt.

Nach unseren Ergebnissen hat der Harmin-Tremor ganz andere pharmakologische Eigenschaften als der Nicotin-Tremor. Besonders auffallend ist, daß beim Harmin-Tremor Atropin, Scopolamin und Belladonnin antagonistisch wirken, während sie den Nicotin-Tremor nur sehr wenig oder überhaupt nicht vermindern (Bovet u. Longo 1951, Cahen u. Lynes 1951, Hotovy 1954). Zieht man die Befunde anderer Autoren am Kaninchen zum Vergleich heran (Tab. 4), so erkennt man, daß die quantitativen Beziehungen zwischen den gegen den Tremor wirkenden Pharmaka bei Nicotin ganz anders sind als bei Harmin. Ähnliches geht auch aus Tab. 5 hervor, die sich nur auf Mäuse bezieht. Obwohl in Tab. 5

Tabelle 3. *Verhalten der Körpertemperatur der Mäuse (pro Dosi 10, bei NaCl-Lösung 5 Tiere) 16 min nach der Injektion der Antagonisten, die intraperitoneal zur gleichen Zeit wie Harmin (7 mg/kg subcutan) injiziert worden waren*

gleichzeitig mit Harmin injiziert	Dosis mg/kg i.p.	gegen den Tremor geschützt %	Mittlere Differenz der Körper-temperatur °C	Mittlerer intra-individueller Fehler ±	p
NaCl-Lösung . .		0	+ 1,28	0,1685	$< 0{,}01$[1]
Chloralhydrat. .	100	30	+ 0,19	0,33	$> 0{,}5$
	200	60	— 0,69	0,33	$> 0{,}5$
Phenytoin . . .	5	30	+ 0,89	0,266	$< 0{,}01$[1]
	10	60	+ 1,46	0,239	$< 0{,}001$[1]
Apomorphin . .	0,6	30	+ 0,24	0,236	$> 0{,}3$
	5	70	— 0,43	0,272	$> 0{,}1$
Cycrimin	10	20	+ 1,2	0,297	$< 0{,}01$[1]
	20	60	— 0,4	0,108	$< 0{,}01$[1]
Soventol	10	30	+ 0,28	0,181	$> 0{,}1$
	20	70	— 0,47	0,283	$> 0{,}1$
Rigidyl	10	20	+ 0,57	0,323	$> 0{,}1$
	20	50	+ 0,17	0,289	$> 0{,}5$
LSD.	0,25	20	+ 0,17	0,0707	$> 0{,}05$
	0,5	60	+ 0,91	0,248	$< 0{,}01$[1]
BOL 148	2,5	20	— 0,74	0,204	$< 0{,}01$[1]
	10	70	— 0,37	0,192	$> 0{,}05$
Hydergin . . .	6	30	— 0,32	0,259	$> 0{,}2$
	12	60	— 1,19	0,219	$< 0{,}001$[1]
Medmain. . . .	5	20	+ 0,77	0,302	$> 0{,}05$
	10	70	— 1,52	0,286	$< 0{,}001$[1]
5-Benzyloxy-gramin. . . .	5	20	+ 1,36	0,245	$< 0{,}001$[1]
	20	70	— 0,82	0,190	$< 0{,}01$[1]
L(—)-Trypto-phan	20	30	+ 0,16	0,35	$> 0{,}6$
	40	60	— 0,06	0,34	$> 0{,}8$
Tryptamin . . .	10	20	+ 0,93	0,177	$< 0{,}001$[1]
	20	90	+ 0,51	0,335	$> 0{,}1$
Indol	15	20	— 0,55	0,281	$> 0{,}1$
	30	70	— 1,62	0,388	$< 0{,}01$[1]

[1] Temperatur-Differenz ist signifikant!

nur vier Substanzen miteinander verglichen werden, kann man doch erkennen, daß die Wirksamkeit dieser Pharmaka gegen den Harmin-Tremor weder mit derjenigen gegen Acetylcholin noch der gegen Nicotin erklärt werden kann; dies gilt auch für die Phenothiazine (Abb. 4). Freilich hat der in Tab. 5 vorgenommene Vergleich nur einen begrenzten

Tabelle 4. *Wirksamkeit verschiedener Pharmaka gegen den Nicotin- und Harmin-Tremor. Angegeben sind äquipotente Dosen (ED_{50}) der Antagonisten. A. Nicotin-Tremor des Kaninchens. B. Harmin-Tremor der Maus*

	A[1]		B[2]	
	ED_{50} mg/kg intravenös	relative Potenz (Benzhexol = 100)	ED_{50} mg/kg intra-peritoneal	relative Potenz (Benzhexol = 100)
Adiphenin	1,2	275	23,1	53
Äthopropazin	1,5	220	6,5	189
Caramiphen	1,8	183	14,9	83
Benzhexol	3,3	100	12,3	100
Diäthazin	3,7	89	23,0	53
Phenytoin	16	21	7,6	162
Mephenesin	25	13	32,9	37
Scopolamin	49	6,7	16,4	75

[1] Cahen u. Lynes (1951); Cahen, Thomas u. Tvede (1953).
[2] Eigene Werte.

Tabelle 5. *Vergleich der Wirksamkeit einiger Pharmaka gegen letale Dosen (ED_{100}) von Nicotin und Acetylcholin sowie gegen den Harmin-Tremor. Versuchstiere: Mäuse. Angegeben sind äquipotente Dosen der Antagonisten*

	Anti-Nicotin[1]		Anti-Harmin		Anti-Acetylcholin[1]	
	ED_{50} mg/kg subcutan	relative Potenz (Diäthazin = 100)	ED_{50} mg/kg intra-peritoneal	relative Potenz (Diäthazin = 100)	ED_{50} mg/kg subcutan	relative Potenz (Diäthazin = 100)
Atropin	> 800	< 2	28	82	9	1440
Adiphenin . . .	31	45	23	100	35	370
Diäthazin . . .	14	100	23	100	130	100
Caramiphen . .	31	45	15	153	13	1000

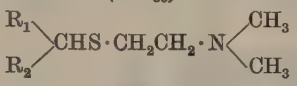
[1] Tripod (1949).

Wert, da den geringfügigen Harmin-Wirkungen die absolut tödlichen Wirkungen von Nicotin und Acetylcholin gegenüberstehen. Gegen die Bedeutung der anticholinergischen Aktivität für die Wirksamkeit gegen den Harmin-Tremor spricht auch, daß durch die Methylierung des Diphenhydramin-Moleküls (Disipal) die anticholinergische Wirksamkeit sich verdoppelt, die Wirkung gegen den Tremor aber unverändert bleibt, und daß durch den Einbau einer tertiären Butyl-Gruppe an

Stelle der Methyl-Gruppe (Brocades XCIXa) die spasmolytische Wirksamkeit gegen Acetylcholin sogar 26fach zunimmt (HARMS 1956), während die Wirkung gegen den Harmin-Tremor auf die Hälfte der von Diphenhydramin sinkt.

Auch eine sedative Wirksamkeit scheint nicht die Voraussetzung für die Wirkung der untersuchten Substanzen gegen den Harmin-Tremor zu sein. Bei zahlreichen Stoffen fanden wir trotz einer guten Wirksamkeit gegen den Tremor die Zeichen der zentralen Erregung, nicht selten das Straubsche Schwanz-Phänomen, das z. B. bei Caramiphen und Scopolamin besonders häufig und deutlich zu sehen war. Andererseits schützten

Tabelle 6. *Vergleich der sedativen Wirksamkeit mit derjenigen gegen den Harmin-Tremor bei einigen Thio-Äthern. Angegeben sind äquipotente Dosen der intraperitoneal injizierten Substanzen (ED_{50}). Versuchstiere: Mäuse*



R_1	R_2	Sedative Wirksamkeit[1]		Wirksamkeit gegen den Harmin-Tremor	
		ED_{50} mg/kg	relative Potenz (Covatin = 100)	ED_{50} mg/kg	relative Potenz (Covatin = 100)
Covatin C_4H_9—S—		9,2	100	11,5	100
N 90 —S—		9,2	100	5,0	230
N 91 —S—		~ 60	~ 15	10,1	114
N 71	C_4H_9	> 60	< 15	21,4	54

[1] WEIDMANN u. PETERSEN (1953).

erst 200 mg/kg Chloralhydrat 60% der Tiere vor dem Tremor, eine Dosis, die bei 4 von 10 Tieren bereits pränarkotische Symptome wie taumelnden Gang und Bewegungsarmut, in einem Falle sogar vorübergehend halbe Seitenlage hervorrief. Um der Bedeutung der sedativen Wirksamkeit nachzugehen, haben wir einige Substanzen von WEIDMANN u. PETERSEN (1953) untersucht, weil diese Autoren für ihre Substanzen die sedative Wirksamkeit bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion quantitativ festgestellt haben. Nach Tab. 6 kann eine sedative Komponente für die Wirksamkeit gegen den Harmin-Tremor nicht von wesentlicher Bedeutung sein. Auch die starke Wirksamkeit von Reserpin scheint uns nicht gegen diese Auffassung zu sprechen, da Reserpin nicht nur die Wirkung von Pentylentetrazol, Coffein und Elektroschock auf das Zentralnervensystem verstärkt und die zentrale Wirkung zahlreicher Depressantien

vermindert (Chen, Ensor u. Bohner 1954, Chen u. Ensor 1954) sondern auch am Gehirn durchaus nicht die bioelektrischen Erscheinungen des Schlafes hervorruft (Rinaldi u. Himwich 1955, Gangloff u. Monnier 1955).

Eigenartig ist die starke Wirksamkeit der Phenothiazinderivate gegen den Harmin-Tremor; Thiazinamium und Äthopropazin waren zwar wesentlich schwächer als Chlorpromazin und Promethazin, aber immer noch deutlich stärker als die Parkinson-Mittel. Die vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften der Phenothiazine (Abb. 4) bieten keine Handhabe zur Erklärung der Wirkungsweise in unserem Falle. Allerdings

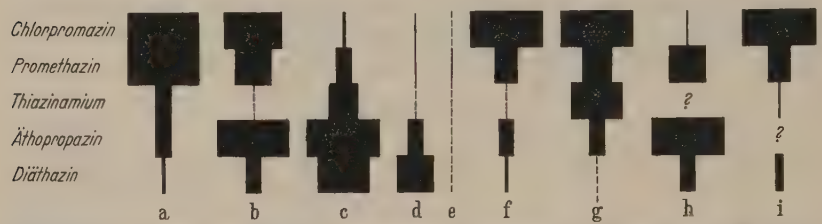


Abb. 4. Relative Wirksamkeit der von uns untersuchten Phenothiazin-Derivate unter verschiedenen pharmakologischen Gesichtspunkten. Die Größen der Flächen sind geschätzt und entsprechen deshalb nur annähernd der Wirksamkeit. — *a* Wirkung gegen den Harmin-Tremor (eigene Ergebnisse). *b* Wirkung gegen den Nicotin-Tremor (Bovet u. Longo 1951, Cahen u. Lynes 1951, Dahlbom, Edlund, Ekstrand u. Katz 1952, Reuse 1952, Cahen, Thomas u. Tvede 1953). *c* Wirkung gegen den Leptazol-Schock (Balestrieri 1955a, b); *d* Wirkung gegen den Elektroschock (Balestrieri 1955a, b, Mercier 1955); *e* Wirkung gegen den Strychnin-Krampf (Balestrieri 1955a, b); *f* sedative oder hypnotische Wirkung (Zipf u. Altstaedter 1954); *g* adrenolytische Wirkung (Malorny 1954; Malorny u. Ohnesorge 1954, Bubnoff, Hoffmann, Schmid u. Taugner 1955); *h* parasympathicolytische Wirkung (Hutcheon 1953, Kopera u. Armitage 1954, Ryall 1956), *i* serotoninolytische Wirkung (Gyermek, Lázár u. Csás 1956)

täuscht wohl die Abb. 4 eine Geschlossenheit der Kenntnisse vor, die in Wirklichkeit nicht existiert; eine gründliche quantitative Untersuchung der Phenothiazine im Sinne der Abb. 4 ist nach wie vor dringend nötig. Immerhin könnten Beziehungen der Anti-Harmin-Wirkung der Phenothiazine zur sedativen und adrenolytischen Wirksamkeit bestehen, was nach den Ergebnissen und Ansichten von Hiebel, Bonvallet u. Dell (1954) auch durchaus möglich wäre. In diesem Sinne sind vielleicht auch Beobachtungen zu verstehen, wonach Adrenalin und Noradrenalin den Parkinson-Tremor (Barcroft, Peterson u. Schwab 1952). sowie den Nicotin-Tremor verstärken (Laurence u. Stacey 1952).

Von zahlreichen Substanzen, die wir hier untersucht haben, ist bekannt, daß sie die Retikulärformation im Mittelhirn beeinflussen und hier vielleicht sogar ihren wichtigsten Angriffspunkt haben (Übersicht: Bovet u. Longo 1956); Rinaldi u. Himwich (1954) fanden sogar eine direkte Beziehung zwischen der lähmenden Wirkung der Parkinson-Mittel auf die Retikulärformation und ihrer klinischen Brauchbarkeit. Andererseits läßt sich Tremor herbeiführen durch die Reizung oder Zerstörung bestimmter Abschnitte der Retikulärformation (Vernier u. Unna 1951, 1953, Jenker u. Ward 1953; Folkerts u. Spiegel 1953) oder durch die

Behandlung der Versuchstiere mit den am gleichen Teil des Hirnstammes angreifenden Substanzen Reserpin und Chlorpromazin (Kaelber u. Joynt 1956, Windle, Cammermeyer, Feringa u. Joralemon 1956).

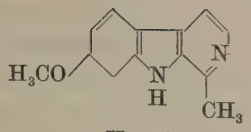
Aus unseren Versuchen geht nicht klar hervor, ob auch Harmin den Tremor hervorruft, indem es die Retikulärformation beeinflußt. Apomorphin wirkte bei uns ebenso wie beim „retikulären" Tremor von Verney u. Unna (1951, 1953) sehr stark antagonistisch, ferner war Scopolamin wirksamer als Atropin; Chlorpromazin und Promethazin, die die retikuläre Formation depressiv beeinflussen, waren gleichfalls wirksame Harmin-Antagonisten. Die starke Wirksamkeit von Reserpin gegen den Harmin-Tremor läßt sich jedoch nicht mit einer Hemmung der Retikulärformation erklären, da Reserpin im akuten Versuch hier aktivierend wirkt (Rinaldi u. Himwich 1955, Gangloff u. Monnier 1955), worauf Rinaldi u. Himwich den Tremor zurückführen, der bei der Reserpin-Therapie oft als störende Nebenerscheinung beobachtet worden ist. Dagegen läßt sich die starke Reserpin-Wirkung vielleicht als eine Verstärkung hemmender Mechanismen deuten (Bein 1955, Schneider, Plummer, Earl u. Gaunt 1955), wie dies Preston (1956) auch für die zentral dämpfenden Wirkungen von Chlorpromazin annimmt.

Gegen eine entscheidende Rolle der retikulären Mittelhirn-Formation bei der Entstehung und Hemmung des Harmin-Tremors spricht ferner 1. die so starke Wirksamkeit von Apomorphin, das nach Brücke, Petsche, Sailer u. Stumpf (1956) beim Kaninchen in niedriger Dosierung (5 mg/kg subcutan) eine „arousal reaction" von mehreren Stunden Dauer hervorruft; 2. die relativ schwache Wirksamkeit von Atropin und Scopolamin im Vergleich zu den Parkinson-Mitteln, von denen nach Vernier u. Unna (1953) Benzhexol und Caramiphen gegen den „retikulären" Tremor schwächer wirken als die beiden Alkaloide; 3. der geringe, wenn auch signifikante Unterschied in der Wirksamkeit von Atropin und Scopolamin, da nach Vernier u. Unna (1953) sowie Longo (1956) die depressive Wirkung von Scopolamin auf die retikuläre Formation mindestens 10mal stärker ist als die von Atropin. Unter diesem Blickwinkel ist die Wirksamkeit von Mephenesin und Myocain gegen den Harmin-Tremor schwer zu deuten, da diese Substanzen die Retikulärformation in verschiedenen Höhen zwar hemmen (Übersicht: Bovet u. Longo 1956), jedoch die arousal reaction nach Stimulierung der Formation nicht verhindern (King 1956). Auch die Wirkungslosigkeit von Meprobamat ist angesichts seiner pharmakologischen Verwandtschaft mit Mephenesin rätselhaft, wenn man einen zu langsamen Eintritt der Wirkung als Ursache ausschließen könnte. Die gemessene mittlere Anzahl der Kontakte betrug nach Meprobamat 93,8 (80,2 bis 109,5) und unterschied sich nicht signifikant vom Normalwert (77,7); bei dieser Dosierung zeigte Meprobamat also nicht die Spur einer Wirkung gegen den Harmin-Tremor. Gegen den Parkinson-Tremor scheint dieses Medikament ebenfalls wirkungslos zu sein. Auch von Benactyzin sollte man auf Grund seiner chemischen Konstitution eine stärkere Wirkung gegen den Harmin-Tremor erwarten, zumal da diese Substanz nach Berger, Hendley u. Lynes (1956) die Weckreaktion nach sensorischer und thalamischer Reizung blockiert und sich hinsichtlich seiner Wirkung auf das EEG nicht von Atropin unterscheidet. Allerdings wirkt Benactyzin nach den gleichen Autoren auf Mäuse erregend und in relativ geringer Dosis konvulsiv (mittlere konvulsive Dosis: 86 ± 6 mg/kg intraperitoneal).

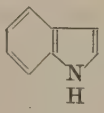
Da nach Woolley (1956) einige Harmala- und Secale-Alkaloide gewisse pharmakologische Wirkungen der Tatsache verdanken könnten, daß sie Antimetaboliten von 5-Oxytryptamin (Serotonin) sind, untersuchten wir, ob Serotonin selbst ein Harmin-Antagonist ist. Nach Woolley (1955) sowie Winter u. Flataker (1956) ist es nämlich möglich,

durch die Zufuhr von Serotonin die Wirkung des Serotonin-Antagonisten Lysergsäurediäthylamid (LSD) auf das Zentralnervensystem abzuschwächen. Da in unseren Versuchen Serotonin tatsächlich gegen den Harmin-Tremor wirkte, könnte man sich fragen, ob die typische zentrale Harmin-Wirkung auf einem Antagonismus von Harmin gegen Serotonin beruht. Da aber auch die Serotonin-Antagonisten LSD, 2-Brom-lysergsäurediäthylamid (BOL 148), Medmain und 5-Benzyloxygramin unerwartet stark gegen den Harmin-Tremor wirkten, muß Harmin wohl doch einen anderen zentralen Wirkungsmechanismus besitzen; Harmin selbst ist ja als Serotonin-Antagonist zum Teil wesentlich schwächer wirksam als die eben erwähnten Substanzen. Deshalb kann auch die starke Wirksamkeit von Reserpin gegen den Harmin-Tremor nicht mit einer Freisetzung von Serotonin im Gehirn erklärt werden (Brodie, Shore u. Pletscher 1956). Auch alle anderen pharmakologischen Eigenschaften dieser Indol-Derivate, seien sie nun phrenotrope oder halluzinogene Substanzen (wie LSD und Harmin selbst) oder nicht, eignen sich nicht zur Erklärung der von uns beschriebenen Wirksamkeit; dies gilt auch von den verschiedenen Hypothesen ihres Wirkungsmechanismus, die wir hier nicht diskutieren wollen. Wir untersuchten deshalb Tryptamin, Tryptophan und Indol, obwohl wir nur auf Grund ihrer chemischen, nicht aber ihrer pharmakologischen Eigenschaften eine Wirkung gegen den Harmin-Tremor erwarten konnten. Daß diese Substanzen in der Tat so beachtlich stark gegen den Tremor wirkten, könnte auf eine große Bedeutung der chemischen Struktur hinweisen, die deshalb für die in Frage kommenden Stoffe dargestellt sei.

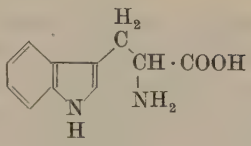
Wir glauben, daß die gleichsinnige und starke Wirksamkeit dieser Substanzen gegen den Harmin-Tremor den Gedanken nahelegt, daß sie am gleichen Substrat wie Harmin angreifen und hier auf Grund ihrer Eigenschaft als Indol-Derivate mit Harmin konkurrieren. Diese Vorstellung wird vielleicht sogar bekräftigt durch die Beobachtung von Windle, Cammermeyer, Feringa, Joralemon, Smart u. McQuillen (1956), daß nach Reserpin bei Affen ein dem Harmin-Tremor ähnlicher grober Ruhe-Tremor auftreten kann; dies wurde auch als Begleiterscheinung der Reserpin-Therapie oft beobachtet. Wir sind uns bewußt, daß man bei dieser schematischen Vorstellung nicht die komplexen Einflüsse vergessen darf, die mehrere der erwähnten Indol-Derivate auf das Gehirn ausüben; einige dieser Wirkungskomponenten könnten eine Anti-Harmin-Wirkung durchaus erklären oder mindestens begünstigen (so gehört Hydergin nicht nur zur „Indol-Familie" sondern wirkt auch sedativ (Rothlin u. Cerletti 1952) und nach Ngai u. Wang (1955) ebenso adrenolytisch wie Chlorpromazin). Dieses Moment ist aber vielleicht doch relativ unbedeutend, da auch bisher „unverdächtige" Substanzen wie Indol, Tryptamin und Tryptophan gegen Harmin bereits sehr wirksam sind.



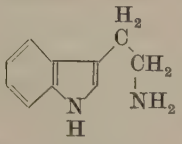
Harmin



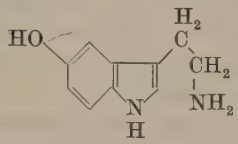
Indol



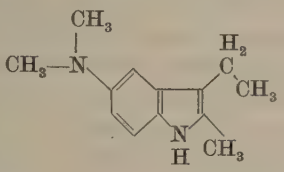
Tryptophan



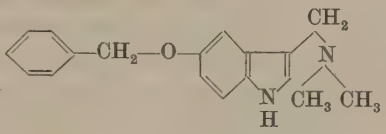
Tryptamin



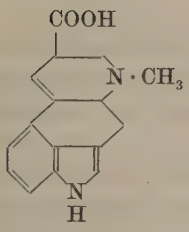
5-Oxytryptamin
(Serotonin)



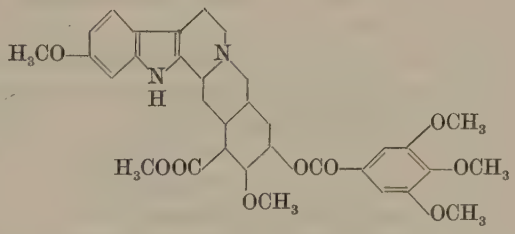
Medmain



5-Benzyloxygramin



Lysergsäure



Reserpin

Abgesehen von dieser Betrachtung lassen sich Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung nur schwer erkennen. Es ist auch fast sinnlos nach solchen Zusammenhängen zu suchen, wenn man die Angriffspunkte der Substanzen nicht kennt. Es ist außerdem unwahrscheinlich, daß jede Substanz nur einen Angriffspunkt hat, dies besonders bei einem so komplizierten Organ wie dem Gehirn. Auch können Substanzen innerhalb des Gehirns teils gleichsinnig, teils antagonistisch wirken; als Beispiel nennen wir Apomorphin, das den Harmin-Tremor ebenso stark abschwächt wie Chlorpromazin, dessen emetische Wirkung aber von Chlorpromazin antagonistisch beeinflußt

wird (Boyd, Cassell, Boyd u. Miller 1955; dort weitere Literatur!). Trotz dieser gebotenen Vorsicht kann man fragen, ob die „gesättigten" cyclischen Substituenten am dem N-Atom gegenüberliegenden Pol der Moleküle Caramiphen, Cycrimin, Benzhexol und Akineton von Bedeutung sind. Daß dies so sein könnte, scheint aus der Tab. 6 hervorzugehen: Wird bei diesen Thio-Äthern die Phenylmercapto-Gruppe (N 91) durch eine Cyclohexylmercapto-Gruppe (N 90) ersetzt, so verdoppelt sich die Wirksamkeit gegen den Harmin-Tremor. Sie nimmt jedoch stark ab, wenn die Butylmercapto-, Phenylmercapto- oder Cyclohexylmercapto-Gruppe durch eine Butyl-Gruppe ersetzt wird (N 71). Dieser Teil des Moleküls muß also möglichst aromatisch sein. Dies dürfte auch das Beispiel von Disipal und seinem Tertiärbutyl-Analogen (Brocades XCIXa) zeigen, wo die Einführung eines größeren Alkylrestes den aromatischen Charakter und damit auch die Wirksamkeit gegen den Tremor vermindert. Dagegen scheint es in unserem Falle nicht von großer Bedeutung zu sein, ob am N-Pol des Moleküls die Dimethylamino- oder die Diäthylamino-Gruppe oder gar der Piperidin-Ring vorhanden sind. Ferner scheint es wenig wichtig zu sein, ob das aliphatische Mittelstück des Moleküls sich von der Essigsäure herleitet (Adiphenin) oder ob es ein Thio-Äther (Tab. 6) oder dessen Sauerstoff-Analogen ist (z. B. Diphenhydramin).

Die Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung sind also nicht sehr charakteristisch, was bei einfacheren Objekten als dem Gehirn den Gedanken an einen vorwiegend physikalisch-chemischen Wirkungsmechanismus nahelegt (Barlow 1955). Daß sich aber hinter diesem wenig differenzierten Gesamtbild komplizierte Vorgänge verbergen können, zeigt das Beispiel des Phenytoins, das überraschend stark gegen den Harmin-Tremor wirkt: Bonnycastle, Paasonen u. Giarman (1956) haben gezeigt, daß nach der Verabreichung von Phenytoin die cerebrale Konzentration von Serotonin ansteigt; Serotonin ist aber nach unseren Befunden ein starker Harmin-Antagonist.

Eignet sich der Harmin-Tremor besser als der Nicotin-Tremor zur Erkennung und Bewertung der Parkinson-Mittel? Sicher müssen zur Klärung dieser Frage noch mehr Erfahrungen mit dem Harmin-Tremor gesammelt werden. Aber der Harmin-Tremor ist dem Nicotin-Tremor mindestens darin überlegen, daß er für Atropin, Scopolamin und Belladonnin sowie für Apomorphin empfindlich ist. Die Empfindlichkeit für Apomorphin ist sogar ganz beachtlich und stellt eine Parallele dar zu der starken Wirksamkeit von Apomorphin gegen den Parkinson-Tremor (Vernier u. Unna 1951, Struppler u. v. Uexküll 1953).

Die Wirkung von Harmin auf die Körpertemperatur ist deshalb interessant, weil Gogerty u. Dille (1956) im Hinblick auf LSD vermuten, daß die pyrogene Wirkung beim Tier und die psychogene Wirkung beim

BOSTON
MAY 26 1958

BOSTON MEDICAL LIBRARY MAY 1961

Menschen Hand in Hand gehen. Auch Harmin wirkt bekanntlich auf die Psyche (Lewin, 1928). Die pyrogene Wirkung von Harmin ist bei Mäusen in der Tat erheblich und dürfte alle bekannten Pyrogene an Schnelligkeit des Wirkungseintritts übertreffen. Daraus wird man auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus des Harmins schließen dürfen; auch die in Tab. 3 aufgeführten Beobachtungen sprechen wohl in diesem Sinne. In unserem Falle konnte Hydergin die Hyperthermie nach Harmin verhindern, die LSD-Hyperthermie wird bei Hunden, Katzen und Kaninchen durch Hydergin jedoch nicht beeinflußt (Horita u. Dille, 1955).

In dem unterschiedlichen Verhalten der Körpertemperatur von Ratten und Mäusen gegenüber Harmin wird eine auffallende Species-Differenz sichtbar. Interessanterweise wirkt auch LSD bei Ratten senkend auf die Körpertemperatur, die nach LSD beim Kaninchen stark ansteigt (Cerletti, 1956). Andererseits wird durch Morphin bei Ratten die Körpertemperatur gesteigert, bei Hunden jedoch gesenkt (Winter u. Flataker 1953). Malorny (1957) schließlich fand keine Unterschiede zwischen Ratten und Mäusen hinsichtlich der Wirkung von Chlorpromazin auf die Körpertemperatur; kleine Dosen wirkten senkend, höhere Dosen steigernd.

Man hat den Eindruck, daß die Wirkung des Harmins auf die Körpertemperatur nicht mit der Tremor erzeugenden Wirkung zusammenhängt. Trotz des divergenten Verhaltens der Körpertemperatur tritt der Harmin-Tremor bei Ratten und bei Mäusen auf. Allerdings ist bei gleicher Harmin-Dosis der Tremor bei der Maus weitaus stärker als bei der Ratte, wodurch der rasche Eintritt der Hyperthermie begünstigt werden könnte. Nach unseren in Tab. 3 dargestellten Ergebnissen sind bei der Maus Tremor und Hyperthermie nicht unbedingt miteinander verknüpft. Ohne weitere Experimente lassen sich diese Erscheinungen jedoch nicht erklären.

Zusammenfassung

Eine Methode wurde ausgearbeitet und dargestellt, mit der die Wirksamkeit von Pharmaka gegen den Harmin-Tremor der Maus quantitativ festgestellt werden kann. Auf diese Weise wurden 41 Substanzen untersucht. Die wirksamsten Antagonisten des Harmin-Tremors waren Lysergsäurediäthylamid, 5-Oxytryptamin (Serotonin), Chlorpromazin (Megaphen), Promethazin (Atosil) und Apomorphin.

Die Körpertemperatur der Maus steigt nach Harmin sofort steil an, bei der Ratte dagegen sinkt die Temperatur. Die Harmin-Hyperthermie der Maus scheint nicht mit dem Harmin-Tremor kausal verknüpft zu sein.

Literatur

Balestrieri, A.: Le azioni di alcuni derivati della fenotiazina nei confronti di agenti convulsivanti. Arch. internat. Pharmacodynamie **100**, 361 (1955a). — Azione anticonvulsivante e struttura molecolare di derivati fenotiazinici. Arch. internat.

Pharmacodynamie **103**, 1 (1955b). — Barcroft, H., E. Peterson and R. S. Schwab: Action of adrenaline and noradrenaline on the tremor in Parkinson's disease. Neurology (Minneapolis) **2**, 154 (1952). — Barlow, R. B.: Introduction to chemical pharmacology. London & New York 1955. — Beer, A. G.: Beiträge zur Pharmakologie des extrapyramidalen Systems. I. Mitteilung: Die Wirkung des Harmins bei Katzen mit intaktem Nervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 377 (1939). — Beiträge zur Pharmakologie des extrapyramidalen Systems. II. Mitteilung: Die Wirkung des Harmins bei Katzen ohne Neocortex. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 393 (1939). — Behrens, B., u. L. Schlosser: Beitrag zur Bestimmung der LD_{50} und der Berechnung ihrer Fehlerbreite. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 59 (1957). — Bein, H. J.: Significance of selected central mechanisms for the analysis of the action of reserpine. Ann. New York Acad. Sci. **61**, 4 (1955). — Berger, F. M., C. D. Hendley and T. E. Lynes: Pharmacology of the psychotherapeutic drug benactyzine (β-diethylaminoethyl benzilate hydrochloride). Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **92**, 563 (1956). — Bonnycastle, D. D., M. K. Paasonen and N. J. Giarman: Diphenylhydantoin and brain-levels of 5-hydroxytryptamine. Nature (London) **178**, 990 (1956). — Bovet, D., and V. Longo: The action on nicotine-induced tremors of substances effective in Parkinsonism. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 22 (1951). — Bovet, D., et V. G. Longo: Pharmacologie de la substance réticulée du tronc cérébral. Résumés des Rapports, XX^e Congrès internat. Physiologie Bruxelles, Seite 306 (1956). — Boyd, E. M., W. A. Cassell, C. E. Boyd and J. K. Miller: Inhibition of the apomorphine-induced vomiting syndrome by antihistaminic agents. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 299 (1955). — Brodie, B. A., P. A. Shore and A. Pletscher: Serotonin-releasing activity limited to rauwolfia alkaloids with tranquilizing action. Science (Lancaster, Pa.) **123**, 299 (1956). — Brücke, F., H. Petsche, S. Sailer u. Ch. Stumpf: EEG-Befunde bei Pseudo-Schmerzreflexen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 408 (1956). — Bubnoff, M. v., D. Hoffmann, E. Schmid u. R. Taugner: Zur sympatholytischen, adrenolytischen und noradrenolytischen Wirkung der Phenothiazine. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 443 (1955). — Cahen, R. L., and T. E. Lynes: Nicotinolytic drugs. I. Drugs inhibiting nicotine-induced tremors. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **103**, 44 (1951). — Cahen, R. L., J. M. Thomas and K. M. Tvede: Nicotinolytic drugs. II. Action of adrenergic blocking agents on nicotine-induced tremors. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 424 (1953). — Chen, G., and C. R. Ensor: Antagonism studies on reserpine and certain CNS depressants. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **87**, 602 (1954). — Chen, G., C. R. Ensor and B. Bohner: A facilitation action of reserpine on the central nervous system. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **86**, 507 (1954). — Cerletti, A.: Lysergic acid diethylamide (LSD) and related compounds. Neuropharmacology, Transactions of the Second Conference, The Josiah Macy, Jr. Foundation, New York 1956. — Dahlbom, R., T. Edlund, T. Ekstrand and A. Katz: The ability of some phenothiazine derivatives to inhibit nicotine-induced tremors. Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 241 (1952). — Everett, G. M.: A study of tremor and the Parkinson-like syndrome produced by 1,4-di-pyrrolidino-2-butyne, „Tremorine". Résumés des Communications, XXe Congrès internat. Physiologie, Bruxelles, Seite 281 (1956). — Everett, G. M., L. E. Blockus and I. M. Shepperd: Tremor induced by Tremorine and its antagonism by anti-Parkinson drugs. Science (Lancaster, Pa.) **124**, 79 (1956). — Everett, G. M., L. E. Blockus, I. M. Shepperd and J. E. P. Toman: Production of tremor and a Parkinson-like syndrome by 1,4-di-pyrrolodino-2-butyne, „Tremorine". Federat. Proc. **15**, 420 (1956). — Flury, F.: Beiträge zur Pharmakologie der Steppenraute (Peganum Harmala). Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **64**, 105 (1911). — Folkerts, J., and E. Spiegel: Tremor on stimulation of the midbrain

tegmentum. Confinia neur. (Basel) **13**, 193 (1953). — Gaddum, J. H.: Simplified mathematics for bioassays. J. of Pharmacy a. Pharmacol. **5**, 345 (1953). — Gangloff, H., u. M. Monnier: Topische Bestimmung des zerebralen Angriffs von Reserpin. Experientia (Basel) **11**, 404 (1955). — Gogerty, J. H., and J. M. Dille: Tolerance to the pyretogenic effects of lysergic acid diethylamide. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 450 (1956). — Gyermek, L., J. Lázár and A. Z. Csák: The antiserotonin action of chlorpromazine and some other phenothiazine derivatives. Arch. internat. Pharmacodynamie **107**, 62 (1956). — Hara, S.: Pharmacological studies on the functions of the extrapyramidal system. Report No. 1. Jap. J. Pharmacol. **2**, 127 (1953). — Hara, S., and K. Kawamori: Pharmacological studies on the extrapyramidal system. Report No. 2. Mechanism of the appearance of tremor due to extrapyramidal poisons. Jap. J. Pharmacol. **3**, 149 (1954). — Harms, A. F.: Synthesis and pharmacological properties of a series of substituted dimethylaminoethyl benzhydryl ethers. Acad. Thesis. Amsterdam 1956. — Hiebel, G., M. Bonvallet et P. Dell: Action de la chlorpromazine „Largactil", 4560 R.P.) au niveau du système nerveux central. Semaine Hôp. **1954**, 2346. — Horita, A., and J. M. Dille: The pyretogenic effect of lysergic acid diethylamide. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 29 (1955). — Hotovy, R.: Zur Pharmakologie des Belladonnins. Arzneimittel-Forsch. **4**, 287 (1954). — Hutcheon, D. E.: A comparison of the pharmacological actions of phenothiazine derivatives used in the treatment of Parkinsonism. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 340 (1953). — Jenker, F. L., and A. Ward jr.: Bulbar reticular formation and tremor. Arch. of Neur. **70**, 489 (1953). — Kaelber, W. W., and R. J. Joynt: Tremor production in cats given Chlorpromazine. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **92**, 399 (1956). — Kawamori, K.: Pharmacological studies on the function of the extrapyramidal system. Report I. Significance of corpus striatum in the presence of extrapyramidal poisons. Fol. jap. Pharmacol. **50**, 17 (1954). — King, E. E.: Differential action of anesthetics and interneuron depressants upon EEG arousal and recruitment responses. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 404 (1956). — Kopera, J., and A. K. Armitage: Comparison of some pharmacological properties of chlorpromazine and pethidine. Brit. J. Pharmacol. **9**, 392 (1954). — Laurence, D. R., and R. S. Stacey: The effect of methonium compounds on nicotine convulsions. Brit. J. Pharmacol. **7**, 80 (1952). — Lewin, L.: Untersuchungen über Banisteria Caapi Spr. (ein südamerikanisches Rauschmittel). Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **129**, 133 (1928). — Longo, V. G.: Effects of scopolamine and atropine on electroencephalographic and behavioral reactions due to hypothalamic stimulation. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 198 (1956). — Malorny, G.: Differenzierung der Spartein- und Megaphenwirkung mit Hilfe pharmakologischer Testmethoden. Anaesthesist **3**, 177 (1954). — Malorny, G.: Persönliche Mitteilung (1957). — Malorny, G., u. F. K. Ohnesorge: Zur Wirkungsweise ganglienblockierender Substanzen. Klin. Wschr. **1954**, 288. — Marković, L., et J. Giaja: L'Harmine, la thermorégulation et la léthargie hypoxique. J. de Physiol. **43**, 69 (1951). — Marler, E. E. J.: Pharmacological and chemical synonyms. Amsterdam 1956. — Mercier, J.: Sur l'action anticonvulsivante expérimentale de la chlorpromazine. C. r. Soc. Biol. (Paris) **149**, 379 (1955). — Neuner, A., u. H. Tappeiner: Über die Wirkungen der Alkaloide von Peganum Harmala, insbesondere des Harmalins. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **35**, 69 (1895). — Ngai, S. H., and S. C. Wang: Comparative study of adrenergic blocking properties of thorazine and hydergine. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 41 (1955). — Preston, J. B.: Effects of chlorpromazine on the central nervous system of the cat: a possible neural basis for action. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **118**, 100 (1956). — Reuse, J. J.: A propos des propriétés antinicotiniques de certaines dérivés de la thiodiphenylamine. Arch. internat. Pharmacodynamie **89**,

117 (1952). — Rinaldi, F., and H. E. Himwich: The site of action of anti-Parkinson drugs. Amer. J. Physiol. **179**, 665 (1954). — A comparison of the effects of reserpine and some barbiturates on the electrical activity of cortical and subcortical structures of the brain of rabbits. Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955). — Rothlin, E., u. A. Cerletti: Über einige pharmakologische Untersuchungen an Mäusen mit kongenitaler Drehsucht. Helv. physiol. Acta **10**, 319 (1952). — Ryall, R. W.: Some actions of chlorpromazine. Brit. J. Pharmacol. **11**, 339 (1956). — Schneider, J. A., A. J. Plummer, A. E. Earl and R. Gaunt: Neuropharmacological aspects of reserpine. Ann. New York Acad. Sci. **61**, 17 (1955). — Struppler, A., u. Th. v. Uexküll: Untersuchungen über die Wirkungsweise des Apomorphin auf den Parkinsontremor. Z. klin. Med. **152**, 46 (1953). — Tripod, J.: Some relationships between antinicotine activity and specific antagonisms. Brit. J. Pharmacol. **4**, 323 (1949). — Vernier, V. G., and K. R. Unna: Some central nervous system effects of apomorphine. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **103**, 365 (1951). — Effects of anti-Parkinsonian drugs on tremor monkeys. Federat. Proc. **12**, 376 (1953). — Weidmann. H., and P. V. Petersen: A new group of potent sedatives. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 201 (1953). — Windle, W. F., J. Cammermeyer, E. R. Feringa, J. Joralemon, J. O. Smart and M. P. McQuillen: Tremor in african green monkeys. Federat. Proc. **15**, 202 (1956). — Winter, C. A., and L. Flataker: The relation between skin temperature and the effect of morphine upon the response to thermal stimuli in the albino rat and the dog. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 183 (1953). — Effects of lysergic acid diethylamide upon performance of trained rats. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **92**, 285 (1956). — Woolley, D. W.: Proc. Nat. Acad. Sci. **41**, 338 (1955); zit. nach Winter u. Flataker (1956). — Arzneimittel und Antimetaboliten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 68 (1956). — Zetler, G.: Substanz P, ein Polypeptid aus Darm und Gehirn mit depressiven, hyperalgetischen und Morphin-antagonistischen Wirkungen auf das Zentralnervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 513 (1956a). — Wirkungsunterschied zwischen den Polypeptiden Bradykinin und Substanz P am Zentralnervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 148 (1956b). — Zipf, H. F., u. R. Altstaedter: Die hypnotische Wirkung von Luminal und Evipan in Kombination mit Megaphen und anderen Phenothiazin-Derivaten. Arzneimittel-Forsch. **4**, 14 (1954).

Doz. Dr. G. Zetler,
Pharmakologisches Institut der Universität, Kiel, Hospitalstr. 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 55—62 (1957)

Aus dem pathophysiologischen Institut der Universität Pécs

Über die Wirkung von Hypothalamusläsionen auf die Nahrungsaufnahme und Nahrungswahl der Ratte

Von

I. Andik, J. Bank und Sz. Donhoffer

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. März 1957)

Im Laufe klinischer Beobachtungen erkannte Mohr[24] bereits vor mehr als hundert Jahren, daß der Hypothalamus in der Regulation der Energiezufuhr und des Energieverbrauches eine Rolle spielt. Erdheim[16] verfocht diesen Standpunkt bereits mit großer Bestimmtheit und suchte demgemäß auch im FröhlichschenSyndrom die Ursache der Stoffwechselstörung im Hypothalamus. Den experimentellen Nachweis, daß die Fettsucht nicht die Folge einer Störung der Hypophysenfunktion ist, sondern durch eine Schädigung hypothalamischer Mechanismen bedingt ist, erbrachten Camus u. Roussy[10, 11] sowie Smith[25, 26], indem sie weder nach totaler, noch nach partieller Entfernung der Hypophyse eine Fettsucht sich entwickeln sahen, wenn nur die Hirnbasis bei der Operation unbeschädigt blieb.

Die von Hess[17], sowie von Horsley und Clarke[12] entwickelten Methoden, die eine gezielte Läsion, bzw. eine gezielte Reizung umschriebener Stellen des Gehirns ermöglichen, erleichterten auch die Untersuchung der zentralnervösen Regulation der Nahrungsaufnahme. Hetherington u. Ranson[18] erzielten eine maximale Fettsucht mit Läsionen der ventromedialen Kerne; ähnliche Beobachtungen machten Brobeck, Teppermann u. Long[9] an der Katze und am Affen. Mit der Entwicklung der Fettsucht ist eine Steigerung der Nahrungsaufnahme auf das Zwei- bis Dreifache verbunden[19, 20, 21].

Der ausschlaggebende Faktor, der zur Entwicklung der Fettsucht führt, wird heute allgemein in der Hyperphagie erblickt; einer verminderten Aktivität, also einer Senkung des Energiebedarfes, wird höchstens eine untergeordnete Rolle zugeschrieben. Die Hyperphagie wurde öfters bereits nach dem Schwinden der Narkose beobachtet; ihr näherer Mechanismus ist unbekannt.

Mayer[23] zieht wohl zur Erklärung der Hyperphagie seinen „glucostatischen Mechanismus" heran, Brobeck[8] bringt sie mit einer Störung der Thermoregulation in Zusammenhang, doch sind die experimentellen Grundlagen beider Erklärungsversuche völlig unzureichend.

Im Gegensatz zu medialen Läsionen kam es nach lateralen Läsionen überhaupt zu keiner spontanen Nahrungsaufnahme mehr, und die Tiere gingen an Inanition zugrunde[1, 2]. Eine Reizung derselben Region löste jedoch Hyperphagie aus[13].

Beobachtungen über Steigerung oder Verminderung bzw. Verweigerung der Nahrungsaufnahme nach Hypothalamusläsionen stehen also ziemlich reichlich zur Verfügung, umso spärlicher sind Untersuchungen, die sich mit qualitativen Änderungen, das heißt, mit Änderungen der Nahrungswahl während der Hyperphagie, befassen. Eigentlich bemerkt nur Souleirac[27], daß nach Hypothalamusläsionen fettsüchtig gewordene Ratten eine besondere Vorliebe für Glucose entwickeln. Es schien uns daher wünschenswert, neben der Registrierung der Kalorienzufuhr hauptsächlich nach Veränderungen in der Nahrungswahl zu fahnden.

Methodik

Zu allen Versuchen wurden an das Laboratorium gewohnte, in Einzelkäfigen untergebrachte männliche Ratten von 200—250 g Körpergewicht verwandt, denen neben Wasser ständig die drei in Tab. 1 angegebenen Futterarten zur Verfügung standen. Die einzelnen Futter wurden in einem, ein Verstreuen möglichst einschränkenden Futterhalter dargereicht, in dem die Lage der einzelnen Futter ständig gewechselt wurde. Die verbrauchten Futtermengen wurden täglich zur selben Stunde durch Wägen bestimmt. Wachstumskurven von Ratten, die von den drei Futterarten frei wählen konnten, unterscheiden sich nicht von der für gut ernährte Wistarratten angegebenen. Das stärkereiche Futter sichert auch allein ein tadelloses Gedeihen; wird das caseinreiche und das fettreiche Futter allein über längere Zeit dargeboten, so bleiben die Tiere im Wachstum zurück, doch bleiben sie einige Wochen im guten Zustand. Das Körpergewicht wurde jeden zweiten oder dritten Tag gemessen. Nachdem innerhalb zwei bis drei Wochen der Verbrauch der einzelnen Futterarten ziemlich konstant wurde, kam eine abermals zwei bis drei Wochen währende Vorperiode. Hiernach wurden im Hypothalamus mit einem von Szentágothai modifizierten Horsley-Clarkeschen Apparat bilaterale elektrolytische Läsionen gesetzt (4—6 mA, 5—6 sec). Die Nahrungsaufnahme und Nahrungswahl wurde dann mindestens 8—10 Wochen, gewöhnlich aber durch 3—4 Monate weiter verfolgt. Von Zeit zu Zeit wurde auch der Blutzucker und der O_2-Verbrauch bestimmt und die thermoregulatorischen Reaktionen auf verschiedene Umgebungstemperaturen geprüft. Nach Beendigung der Versuche oder nach Eingehen der Tiere wurden mittels Serienschnitten des Hypothalamus die Läsionen genau lokalisiert. Für die histologische Untersuchung sind wir Herrn Dr. B. Mess (Anatomisches Institut der Univ. Pécs) zu Dank verpflichtet.

Ergebnisse und Besprechung

Von den 25 lädierten Ratten entwickelte sich bei 5 eine ausgesprochene Hyperphagie und Fettsucht. Bei allen fünf fanden sich bilaterale Läsionen des ventromedialen Kernes, etwa der Abb. 1 entsprechend. In allen anderen zwanzig Tieren haben die Läsionen die ventromedialen Kerne entweder verschont oder aber nur unilateral geschädigt. Von unspezifischen Reaktionen in den ersten Tagen nach der Operation abgesehen,

fand sich bei keiner dieser Ratten eine Änderung der Nahrungsaufnahme und Nahrungswahl gegenüber normalen oder scheinoperierten Ratten. Bei den Ratten, bei denen sich eine Fettsucht entwickelte, sowie bei einigen anderen, schloß sich an die Läsion eine Polydipsie und Polyurie an, die aber in einigen Tagen abklang. Ein permanenter Diabetes insipidus wurde in keinem Falle beobachtet. Einige Zeit nach der Läsion waren manche Tiere unruhig, später nahm die Aktivität ab.

Abb. 1. Typische bilaterale, zur Fettsucht führende Läsion der ventromedialen Kerne, eingezeichnet in das Schema des Rattenhypothalamus nach Krieg[22]

Abb. 2 faßt die Ergebnisse der Ratten zusammen, denen während der ganzen Versuchsdauer ad libitum Futter zur Verfügung stand. Im Gegensatz zu einigen Beobachtungen schloß sich die Hyperphagie in keinem Falle sofort an die Operation an, sondern entwickelte sich erst in der vierten Woche; am frühesten wurde ein Ansteigen der Nahrungsaufnahme am Ende der zweiten postoperativen Woche beobachtet.

Aus Abb. 2 ist ersichtlich, daß im Laufe der vierten postoperativen Woche die Nahrungsaufnahme steil ansteigt und alsbald nahezu das Zweifache der früheren Calorienzufuhr erreicht. Der Nahrungsaufnahme folgt das Ansteigen des Körpergewichtes. Nach einer gleichmäßigen maximalen Polyphagie von etwa sechs Wochen Dauer sank die Nahrungsaufnahme bei allen fünf Tieren und stabilisierte sich auf einem niedrigeren Niveau. Gleichzeitig bleibt auch eine weitere Zunahme des Körpergewichtes aus, und es bildet sich ein neues Gleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch aus.

Wendet man das Augenmerk auf die qualitativen Änderungen in der Nahrungsaufnahme, so fällt sofort der steile Anstieg im Verbrauch des caseinreichen und des fettreichen Futters auf, dem eine verhältnismäßig bedeutend geringere Steigerung der Aufnahme des stärkereichen Futters

gegenübersteht; auch steigert sich die Aufnahme des stärkereichen Futters erst einige Tage nachdem sich der Verbrauch der beiden anderen um das mehrfache erhöht hat.

Aus Tab. 1 geht hervor, daß die Ratten vor dem Eintritt der Polyphagie ihren Energiebedarf ganz überwiegend mit dem stärkereichen Futter deckten, dagegen fielen auf dem Höhepunkt der Polyphagie über zwei Drittel des Anstiegs auf die beiden anderen Futterarten und zwar zu etwa gleichen Teilen. Der Mehrbedarf an Calorien in dieser Periode wird in annähernd gleichen Teilen von den drei Futtern bestritten, also in einem ganz anderen Verhältnis als diese an der Deckung des Bedarfes vor Eintritt der Polyphagie teilnahmen. Auch nach dem Schwinden der maximalen Hyperphagie und der Wiederherstellung eines neuen Gleichgewichtes zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch beteiligen sich die drei Futterarten in einem anderen Verhältnis an der Deckung des Bedarfes als vor Eintritt der Hyperphagie. Bei so langfristigen Versuchen können wohl bei Änderungen des zur Zubereitung des Futters verwandten Caseins oder der Qualität der Stärke bzw. des Schweinefetts Verschiebungen in dem Verhältnis der von den einzelnen Futterarten gedeckten Calorien eintreten, auch kann ohne erkennbare Ursache in so langer Zeit eine Schwankung im prozentualen Anteil der einzelnen Futterarten vorkommen, doch wurden Verschiebungen von ähnlichem Ausmaß ansonsten aus diesen Ursachen nie beobachtet. Teil B von Tab. 2 beweist, daß in diesen Versuchen es sich um keine Veränderungen dieser Art handelt. Die einzelnen Perioden geben Mittelwerte wieder aus denselben Tagen wie jene der entsprechenden Periode der erfolgreich lädierten Tiere; alle erhielten das gleiche Futter, und auch die Scheinoperation wurde an denselben Tagen ausgeführt. Der etwas größere Anteil des casein- und fettreichen Futters an der Nahrungsaufnahme in Periode I und der entsprechend geringere Anteil des

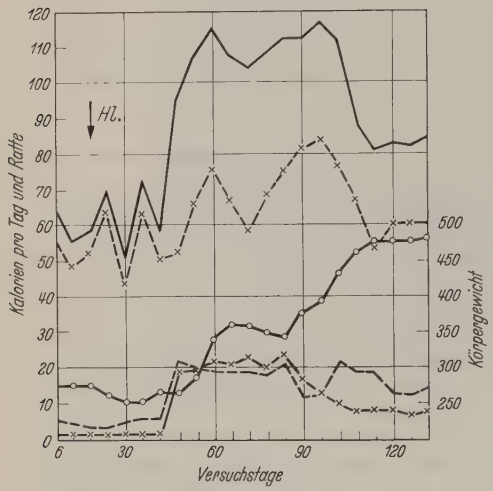


Abb. 2. Calorienaufnahme und die durch die einzelnen Futterarten gelieferten Calorien von fünf Ratten mit bilateralen Läsionen der ventromedialen Kerne des Hypothalamus (Mittelwerte von je sechs Tagen)- —— Gesamtcalorienaufnahme pro Tag und Ratte; × - - - × Calorien aus dem stärkereichen Futter pro Tag und Ratte; × —— × Calorien aus dem caseinreichen Futter pro Tag und Ratte; - - - - Calorien aus dem fettreichen Futter pro Tag und Ratte; o——o Körpergewicht

stärkereichen Futters liegt innerhalb der üblichen Streuung. Der Anstieg der Nahrungsaufnahme in Periode II ist mit einem raschen Anstieg des Körpergewichtes von 250 auf 300 g verbunden und bleibt auch dem erhöhten Körpergewicht entsprechend auf etwa dem gleichen Niveau in Periode III. Der Anstieg im Verbrauch des fettreichen Futters in Periode II wäre an sich noch nicht signifikant, doch zeigt es sich bei näherer Analyse, daß die gesamte Steigerung auf die Zeit fällt, in der mit dem Wachstum das Körpergewicht rasch anstieg, dagegen unterschied sich in den letzten zwei Wochen, also nach Stabilisation des Körpergewichtes,

Tabelle 1. *Zusammensetzung der Futterarten*

Standardgemisch	I. Caseinreiches Futter	II. Fettreiches Futter	III. Stärkereiches Futter
Salzgemisch 100 g	Milch 5 g	Milch 5 g	Milch 5 g
Trockenhefe 600 g	Salzgemisch 15 g	Salzgemisch 15 g	Salzgemisch 15 g
Casein 1800 g	Standard-gemisch 150 g	Standard-gemisch 50 g	Standard-gemisch 150 g
Maisschrot 7800 g	Casein 300 g	Schweine-schmalz 100 g	Weizen-stärke 300 g
	100 g dieses Gemisches werden mit 170 ml einer Gelatinelösung vermischt und dann im Eisschrank aufbewahrt. Calorienwert pro Gramm etwa 1,3	Diesem Futtergemisch wird keine Gelatinelösung hinzugefügt, da die Konsistenz ein Zerstreuen auch ohne dies verhindert. Calorienwert pro Gramm etwa 7,0	100 g dieses Gemisches werden mit 100 ml einer Gelatinelösung vermischt und dann im Eisschrank aufbewahrt. Calorienwert pro Gramm etwa 1,8

die Aufnahme dieser Futterart nicht von jener in Periode I und III. Die durch normales Wachstum bedingte Steigerung verteilt sich wie ersichtlich ganz anders auf die drei Futterarten als bei der Polyphagie nach Läsion der vertromedialen Kerne des Hypothalamus.

Auch durch andere Reize bedingte Steigerungen der Nahrungsaufnahme unterscheiden sich betreffs der Verteilung auf die drei Futterarten von der hypothalamischen Polyphagie. Selbst bei Steigerung der Kalorienaufnahme auf das Zweifache durch Thyroxin wird der ganze Mehrbedarf durch das stärkereiche Futter gedeckt ohne daß sich der Verbrauch der anderen Futterarten ändern würde[3, 6]. Ähnlich verhält sich auch die Maus, die unter Thyroxinwirkung bei zunehmender Aufnahme des stärkereichen Futters sogar weniger von dem fettreichen Futter verzehrt, obwohl ansonsten die Maus — im Gegensatz zur Ratte — eine ausgesprochene Vorliebe für dieses zeigt[15]. In derselben Weise wie

Thyroxin beeinflußt die Kälte die Nahrungswahl; der ganze Mehrbedarf wird mit stärkereichem Futter gedeckt. Wieder ganz anders wirkt sich die Muskelarbeit auf die Nahrungswahl der Ratten aus: Der Mehrbedarf wird ganz aus dem fettreichen und caseinreichen Futter bestritten und sogar ein Teil ehedem aus den stärkereichem Futter stammenden Calorien wird durch die zwei anderen Futterarten ersetzt[4]. Dasselbe sieht man bei der Ratte nach sechstägigem Hungern; bei freier Wahl erhöht sich die

Tabelle 2. *Die aus den drei Futterarten aufgenommenen Calorien bei Ratten mit bilateralen Läsionen der ventromedialen Kerne und an scheinoperierten Tieren.* Periode I. umfaßt 42 Tage, Periode II. 60 Tage, und Periode III. 24 Tage. Mittelwerte pro Ratte und Tag

A. Läsion der ventromedialen Kerne

	Caseinreiches Futter				Fettreiches Futter				Stärkereiches Futter			
	Cal. abs	Anstieg %	Cal. %	Anteil am Anstieg %	Cal. abs	Anstieg %	Cal. %	Anteil am Anstieg %	Cal. abs	Anstieg %	Cal. %	Anteil am Anstieg %
I. Vor der Polyphagie	2	—	3	—	4	—	6	—	57	—	91	—
II. Auf der Höhe der Polyphagie	22	1100	19	37	21	520	18	31,5	74	30	63	31,5
III. Nach Eintreten des Gleichgewichts	9	450	11	33	15	380	18	52	60	5	71	14
B. Scheinoperierte Ratten												
Periode I. . . .	7	—	13	—	6	—	11	—	40	—	76	—
Periode II. . .	5	∅	8	∅	9	50	14	25	51	28	78	75
Periode III. . .	5	∅	8	∅	5	∅	8	∅	52	30	84	100

Calorienaufnahme und diese wird nicht nur allein von dem fettreichen Futter bestritten, sondern gleichzeitig frißt die Ratte weniger von dem ansonsten bevorzugten stärkereichen Futter[5].

Alle Ratten, bei denen sich eine Fettsucht entwickelte, verhielten sich betreffs der Nahrungswahl einheitlich; der Mehrbedarf wurde bei allen Tieren durch Erhöhung der Zufuhr aller drei Futterarten gedeckt. Nach Eintreten des neuen Gleichgewichtes wurde jedoch der Mehrbedarf überwiegend von dem kaseinreichen und fettreichen Futter geliefert. Eine isolierte Änderung in der Aufnahme der einen oder anderen Futterart konnte bisher durch zentralnervöse Läsionen in keinem einzigen Falle ausgelöst werden, was nicht besagt, daß es bei zentralen Läsionen zu keiner solchen Änderung kommen kann.

Die durch Läsion der ventromedialen Kerne ausgelöste Störung der Regulation ist irreversibel. Dies deutet einerseits die auch nach der Ausbildung eines neuen Gleichgewichtes verändert bleibende Nahrungswahl an. Andererseits konnte auch Brobeck's Beobachtung[7] bestätigt werden, daß nach der durch Nahrungseinschränkung hervorgerufenen Reduktion des Körpergewichtes bei Aufhebung der Beschränkung die Polyphagie wieder in voller Ausbildung in Erscheinung tritt und das Gleichgewicht wieder bei dem Körpergewicht erreicht wird, bei dem es sich ehedem, vor gewaltsamer Reduktion des Körpergewichtes eingestellt hatte.

In Anbetracht dessen, daß neuerdings einerseits dem Blutzucker, andererseits der Thermoregulation eine grundlegende Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme zugesprochen wird, wurde des öftern der Blutzucker untersucht und das thermoregulatorische Verhalten bei verschiedenen Umgebungstemperaturen beobachtet. Der Blutzucker war immer normal und auch die Körpertemperatur und der O_2-Verbrauch reagierten auf Änderungen der Umgebungstemperatur wie bei normalen Ratten. Jedoch kam es der Fettsucht entsprechend bereits bei einer Umgebungstemperatur von 31° C (in praktisch mit Wasserdampf gesättigter Luft) zu einer ausgesprochenen Erhöhung der Körpertemperatur, wie sie bei nicht fettsüchtigen Ratten unter den gleichen Bedingungen erst bei etwa 33—35° C beobachtet wird (Abb. 3). Auch der Grundumsatz zeigt normale Werte. Es ließ sich daher keine Andeutung finden, daß die Polyphagie mit den glucostatischen Mechanismen Mayers[22] oder mit Störung des Thermoregulation im Sinne Brobecks[8] erklärbar wäre.

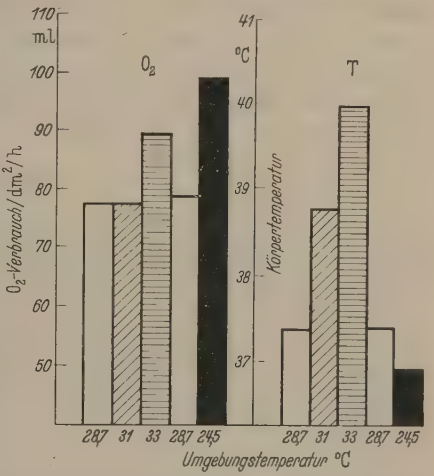


Abb. 3. O_2-Verbrauch und Körpertemperatur einer hyperphagischen fettsüchtigen Ratte bei verschiedenen Umgebungstemperaturen. Bei 31° C besteht bereits eine ausgesprochene Hyperthermie, und bei 33° C erreicht die Körpertemperatur 40° C und es kommt bereits zur hyperthermischen Steigerung des O_2-Verbrauches

Zusammenfassung

An 25 Ratten wurde vor und nach bilateralen elektrolytischen Läsionen des Hypothalamus, sowie bei einigen Tieren vor und nach Scheinoperationen die Gesamtcalorienaufnahme sowie deren Verteilung zwischen einem caseinreichen, einem fettreichen und einem stärkereichen Futter beobachtet. Bei 5 Ratten mit bilateralen Läsionen der

ventromedialen Kerne entwickelte sich eine Polyphagie und Fettsucht. Die Nahrungsaufnahme stieg beinahe auf das Zweifache und die Mehrzufuhr wurde zu etwa gleichen Teilen von den drei Futterarten gedeckt. Dabei stieg die Aufnahme des casein- und fettreichen Futters auf das Mehrfache, während sich der Verbrauch des stärkereichen Futters bloß um 30% erhöhte. Nach Stabilisierung des Körpergewichtes wurde nahezu der gesamte Mehrbedarf von dem kasein- und dem fettreichen Futter gedeckt. Läsionen, die wenigstens einseitig den ventromedialen Kern verschonten, sowie Scheinoperationen hatten keine wesentlichen Änderungen in der Nahrungswahl zur Folge. Die Beobachtungen werden mit anderen bei Erhöhung des Nahrungsbedarfes eintretenden Änderungen in der Nahrungswahl verglichen.

Literatur

[1] Anand, B. K., and J. R. Brobeck: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77**, 323 (1951). — [2] Anand, B. K., S. Dua and K. Shoenberg: J. of Physiol. **127**, 143 (1955). — [3] Andik, I.: Kisérl. Orvostudom. Budapest, im Druck. —[4] Andik, I., J. Bank, I. Moring und Gy. Szegvári: Kisérl. Orvostudom., Budapest **5**, 272 (1953). —[5] Andik, I., Sz. Donhoffer, I. Moring u. J. Szentes: Acta Physiol. (Budapest) **2**, 363 (1951). —[6] Andik, I., Sz. Donhoffer: im Druck. —[7] Brobeck, J. R.: Physiologic. Rev. **26**, 541 (1946). — [8] Brobeck, J. R.: Yale J. Biol. a. Med. **20** 545 (1948). — [9] Brobeck, J. R., J. Tepperman and C. N. H. Long: Yale J. Biol. a. Med. **15**, 831 (1943). — [10] Camus, J., et G. Roussy: C. R. Soc. Biol. (Paris) **75**. 483 (1913). — [11] Camus, J., and G. Roussy: Endocrinology (Springfield, Ill.) **4**, 507 (1920). — [12] Clarke, G.: Science **90**, 32 (1939). — [13] Delgado, I. M. R., and B. K. Anand: Amer. J. Physiol. **172**, 162 (1953). — [14] Donhoffer, Sz., and J. Vönötzky: Amer. J. Physiol. **150**, 329 (1947). — [15] Donhoffer, Sz., and J. Vönötzky: Amer. J. Physiol. **150**, 334 (1947). — [16] Erdheim, J.: Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien. Abt. III. 113, 537 (1904). — [17] Hess, W. R.: Beiträge Zur. Physiologie d. Hirnstammes. Leipzig: G. Thieme 1932. — [18] Hetherington, A. W., and S. W. J. Ranson: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **41**, 465 (1939). — [19] Hetherington, A. W.: Amer. J. Physiol. **133**, 326 (1941). — [20] Hetherington, A. W.: Amer. J. Physiol. **140**, 89 (1943). — [21] Hetherington, A. W.: J. Comp. Neurol. **80**, 33 (1944). — [22] Krieg, J. S.: J. Comp. Neurol. **55**, 19 (1932). — [23] Mayer, J.: Physiologic. Rev. **26**, 541 (1953). — [24] Mohr, I.: Wschr. ges. Heilk., Berlin 565 (1840). — [25] Smith, P. E.: J. Amer. Med. Assoc. **88**, 158 (1927). — [26] Smith, P. E.: Amer. J. Anat. **45**, 205 (1930). — [27] Souleirac, A.: Bull. biol. Françe et Belg. **81**, 274 (1947).

Prof. Dr. Sz. Donhoffer, Pathologisches Institut der Universität Pécs/Ungarn

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 63—77 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Beeinflußbarkeit der rhinencephalen Tätigkeit des Kaninchens

Von
S. Sailer und Ch. Stumpf

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. März 1957)

Im Rahmen einer „arousal reaction“[31] verändert sich die bioelektrische Tätigkeit verschiedener Gehirnteile in einer für bestimmte Regionen charakteristischen Weise. Bereits im Jahr 1939 konnten Jung u. Kornmüller[19] feststellen, daß insbesondere die Ammonshornformation mit dem Subiculum bei akustischer und nociceptiver Reizung völlig andersartige EEG-Veränderungen zeigt als die motorische Rinde, das Striatum und der mediale Thalamuskern. Während solche Reizungen in den letztgenannten Strukturen nach Jung u. Kornmüller[19] zu einer „Hemmung“ der Ruhetätigkeit führen, bewirken sie im Ammonshorn eine rhythmische Aktivierung der unregelmäßigen 2—5 Hz-Tätigkeit auf 5—6 Hz. Die genannten Autoren sprechen von einem funktionellen „Antagonismus“ zwischen der Tätigkeit des Striatum und der der Ammonshornformation. Eingehend untersucht wurde die Tätigkeit des Kaninchen-Rhinencephalon während der Ruhe und bei verschiedenen Reizungen mit Makroelektroden von Green u. Arduini[12, 13], sowie mit Mikroelektroden von Green u. Machne[14]. Green u. Arduini[13] finden, daß „arousal or desynchronization of the neocortical record, whether induced by any one of a variety of afferent stimuli or by direct excitation of the activating mechanism in the brain stem, is invariably associated with the concomitant appearance of an undulating series of large slow waves in the hippocampal record“. In neuerer Zeit wird von verschiedenen Autoren (Gangloff u. Monnier[11], Longo[24], Rinaldi u. Himwich[35]) betont, daß während einer „arousal reaction“ im EEG sowohl Desynchronisierungs- als auch Synchronisierungserscheinungen beobachtet werden können, wobei letztere vor allem im Rhinencephalon, aber auch im Thalamus und im parieto-occipitalen Cortex nachweisbar sind.

Uns interessierte zunächst die Frage, ob Substanzen, die eine Desynchronisierung im präzentralen Cortex verursachen, auch im Hippocampus die bioelektrische Tätigkeit in gleicher Weise verändern wie eine

afferente Reizung, bzw. ob die Analogie zwischen der Wirkung solcher Substanzen und einer „arousal reaction" auf das Elektrocorticogramm beschränkt ist oder nicht. Wir haben für diese Untersuchungen drei cortical desynchronisierend wirkende Pharmaka ausgewählt, von denen auf Grund verschiedener Durchschneidungsversuche[4–6, 9, 16, 36] angenommen werden kann, daß sie zumindest nicht identische Angriffspunkte im ZNS besitzen: Physostigmin, Methylamphetamin und Lysergsäurediäthylamid. Außerdem haben wir neuerlich — in ähnlicher Weise wie Green u. Arduini[12, 13] — die Beeinflußbarkeit der Hippocampustätigkeit durch verschiedene Reize untersucht, wobei wir jedoch insbesondere die Abhängigkeit der Frequenz der Hippocampustätigkeit von der Art und Stärke des Reizes berücksichtigten.

Methodik

Die Versuche wurden an insgesamt 23 wachen, nicht curarisierten Kaninchen im Gewicht zwischen 2,0 und 2,5 kg durchgeführt. Das EEG wurde nach der von Monnier u. Laue[30] angegebenen stereotaktischen Methode abgeleitet und mit Hilfe eines Schwarzer-Elektroencephalographen, Type E 502, registriert. Die Freilegung des Schädeldaches erfolgte nach vorheriger Infiltration der Kopfhaut mit 2%iger Novocainlösung ohne Adrenalinzusatz. Zur Ableitung des Elektrocorticogrammes (ECG) wurden Silberelektroden in den Schädelknochen eingeschraubt; sie waren extradural über der Area praecentralis granularis, parietalis und striata (Nomenklatur nach Rose[37]) lokalisiert. Für die Ableitung aus subcorticalen Strukturen wurden sechs, in einem gemeinsamen Elektrodensockel in Abständen von je 3 mm befestigte, isolierte Nadelelektroden mit freien Spitzen und einer Länge von je 25 mm verwendet. Diese 6fach Tiefenreihenelektrode wurde 4,5 mm paramedian 5 mm subdural in das Gehirn eingeführt, wobei die vorderste Elektrode 1,5 mm vor der Coronarnaht und die hinterste Elektrode 13.5 mm hinter der Coronarnaht lokalisiert war. Bei dieser Lage der Tiefenelektrode kommt entsprechend dem Atlas des Kaninchengehirns von Sawyer et al.[38], sowie nach den Angaben von Petsche u. Monnier[32] und Gangloff u. Monnier[10] die Spitze der vordersten Elektrode im Caput nuclei caudati und die Spitzen der drei folgenden Elektroden im dorsalen Rhinencephalon (Hippocampus) zu liegen. Eine Kontrolle der Elektrodenlage wurde nur in einigen Versuchen durchgeführt; eine solche Kontrolle erweist sich im allgemeinen als nicht notwendig, da wir in Übereinstimmung mit Green u. Machne[14] feststellen konnten, daß die bioelektrische Tätigkeit des Hippocampus beim Kaninchen so charakteristisch ist, daß ihr Auftreten als beweisend für die richtige Elektrodenlage gewertet werden kann. Außerdem konnten wir häufig die Beobachtung machen, daß an jenen Elektroden, deren Spitzen im dorsalen Rhinencephalon liegen, unmittelbar nach dem Einführen charakteristische Krampfstromabläufe nachweisbar sind. Diese Erscheinung findet darin ihre Erklärung, daß das Ammonshorn eine Struktur mit außerordentlich hoher Krampfbereitschaft darstellt (Andy u. Akert[1], Jung[18], Kaada[20], Liberson u. Cadilhac[21], Petsche u. Monnier[32]), so daß offenbar die durch das Einführen der Elektroden gesetzten minimalen Läsionen genügen, um einen rhinencephalen Anfall auszulösen. In allen Versuchen wurde die corticale Tätigkeit von der linken, die subcorticale Tätigkeit hingegen von der rechten Hemisphäre bipolar abgeleitet. Nach dem Einführen der Tiefenelektrode wurde eine Pause von etwa 30 min Dauer eingeschaltet und erst nach Ablauf dieser Zeit mit dem eigentlichen Versuch begonnen. Die Einschaltung einer solchen Pause ist insbesondere dann notwendig,

wenn das Einführen der Tiefenelektrode von einem rhinencephalen Krampfanfall gefolgt ist.

Zur Auslösung einer „arousal reaction" wurden folgende Arten von Reizungen verwendet:

1. Proprioceptive Reizung: passive Beugung und Streckung einer hinteren Extremität. Dauer der Reizung: etwa 5—7 sec.

2. Elektrische Reizung des ascendierenden retikulären Aktivierungssystems (im folgenden als „retikuläre Reizung" bezeichnet). Für diese Reizung wurde eine Heßsche Nadelelektrode von 25 mm Länge und einem Elektrodenabstand von 0,8 mm verwendet. Entsprechend den Angaben von Rinaldi u. Himwich[35] wurde diese Elektrode 12 mm hinter der Coronarnaht, 1,5 mm paramedian (rechts), in eine Tiefe von 13—14 mm unter der Schädeloberfläche eingeführt. Unter diesen Umständen liegen die Elektrodenspitzen in der Formatio reticularis des Mittelhirns in der Höhe der vorderen Vierhügel. Gereizt wurde mit Impulsserien von einer Gesamtdauer von 5 sec; die Dauer des Einzelimpulses betrug 1,5 msec und die Frequenz 250 Hz. Die gewählte Frequenz ist bezüglich der Auslösung einer „arousal reaction" sowohl für Katzen als auch für Kaninchen optimal (Moruzzi u. Magoun[31] bzw. Rinaldi u. Himwich[35]).

3. Periphere Reizung. Als Reizelektrode wurden zwei nicht isolierte Injektionsnadeln verwendet, die in einem Abstand von etwa 1 cm in den rechten M. gastrocnemius eingestochen wurden. Gereizt wurde mit Impulsserien von einer Gesamtdauer von 5 sec; die Dauer des Einzelimpulses betrug 1,5 msec und die Frequenz 50 Hz.

Die elektrischen Reizungen wurden mit Hilfe eines Grass-Stimulators, Modell S 4A, durchgeführt. Reizartefakte konnten durch Zwischenschaltung einer Stimulus Isolation Unit, Grass, Modell SIU 4A, vollständig vermieden werden.

Folgende Substanzen wurden untersucht: Physostigminum salicylicum, 1-Phenyl-2-methylaminopropan (Methylamphetamin) und Lysergsäurediäthylamid (LSD*). Alle Substanzen wurden intravenös injiziert.

Die nachfolgend mitgeteilten Untersuchungsergebnisse betreffen vorwiegend Veränderungen der Hippocampusfrequenz unter verschiedenen Bedingungen. Bei allen diesen Versuchen wurde die Frequenz in der Weise ermittelt, daß die Anzahl der Potentialschwankungen in mehreren aufeinanderfolgenden 2 sec-Perioden ausgezählt wurde.

Ergebnisse

1. Effekte der Reizungen. Proprioceptive Reizung, sowie retikuläre und periphere Reizung mit Spannungen, die über dem Schwellenwert lagen, bewirkten im Hippocampus den typischen, von Green u. Arduini[12, 13] bereits ausführlich beschriebenen Effekt. Abb. 1 zeigt die neocorticale und paläocorticale Tätigkeit während einer durch retikuläre Reizung ausgelösten „arousal reaction". Während sich die „arousal reaction" im präzentralen Cortex in einer Amplitudenabnahme und Frequenzzunahme äußert, zeigt der Hippocampus zur gleichen Zeit eine bis etwa 0,5 mV hohe, regelmäßige Tätigkeit mit einer bipolaren Phasenumkehr 4,5 mm hinter der Coronarnaht. Die gleiche Tätigkeit ist — allerdings mit wesentlich geringerer Amplitude — auch im parietooccipitalen Cortex nachweisbar. Die „arousal reaction" tritt unmittelbar nach Reizbeginn in Erscheinung und überdauert das Reizende, je nach Empfindlichkeit des Tieres und Stärke des Reizes, entweder überhaupt

nicht oder um einige bis mehrere Sekunden. Häufig konnten wir die Beobachtung machen, daß retikuläre oder periphere Reizungen mit niedrigen Spannungen wohl im Hippocampus die für die „arousal reaction" charakteristischen Veränderungen verursachten, die Ruhetätigkeit des Neocortex jedoch völlig unbeeinflußt ließen. Die Schwellenwerte der Spannungen lagen bei den elektrischen Reizungen, von Tier zu Tier variierend, aber bei ein und demselben Tier meist weitgehend

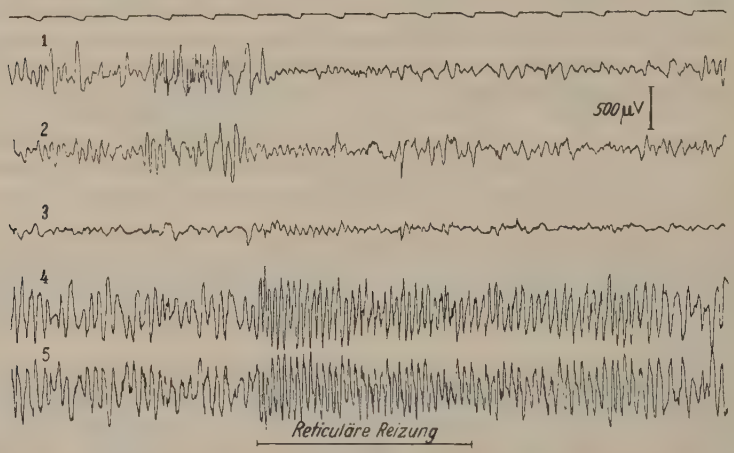


Abb. 1. Kaninchen-EEG. Ableitungen: *1:* Präzentral — parietal, *2:* Parietal — Area striata, *3:* Caput nuclei caudati, *4:* und *5:* Hippocampus. „Arousal reaction" bei elektrischer Reizung der Formatio reticularis des Mittelhirns (0,7 V)

konstant bleibend, für die retikuläre Reizung zwischen 0,5 und 5 V und für die periphere Reizung zwischen 2 und 5 V.

Die *Frequenz* der Hippocampustätigkeit während der durch eine der genannten Reizarten ausgelösten „arousal reaction" zeigt 1. charakteristische Veränderungen während der Reizung und 2. eine typische Abhängigkeit von der Intensität der Reizung. Die Frequenz der regelmäßigen Hippocampustätigkeit ist unmittelbar nach Reizbeginn — genaue Latenzzeitbestimmungen wurden nicht durchgeführt — am höchsten und sinkt dann langsam, und zwar auch bei noch andauernder Reizung, ab. Abb. 2 zeigt dieses Verhalten während und nach proprioceptiven Reizungen. Die in Abb. 2 eingezeichneten Werte stellen Mittelwerte dar, die aus 32 proprioceptiven Reizungen an 7 verschiedenen Tieren gewonnen wurden.

Aus Abb. 2 geht hervor, daß die regelmäßige Hippocampusfrequenz innerhalb der ersten beiden Sekunden nach Beginn der Reizung im Mittel 6,2 Hz beträgt. Die eingezeichnete mittlere quadratische Abweichung ($\pm$ 0,54) ist zu diesem Zeitpunkt praktisch ausschließlich auf die unterschiedliche Reaktion der einzelnen Tiere zu beziehen. Ein

bestimmtes Tier reagierte auf mehrmals wiederholte proprioceptive Reizungen trotz der bei dieser Reizart naturgemäß mehr oder weniger stark variierenden Intensität und Dauer des Reizes im wesentlichen immer mit der gleichen initialen Hippocampusfrequenz, die bei den einzelnen Tieren zwischen 5 und 6,5 Hz lag. Bereits in der zweiten 2 sec-Periode ist die Frequenz trotz anhaltender Reizung auf 5,48 ± 0,55 Hz abgesunken. Beim weiteren Absinken der Hippocampusfrequenz in den folgenden 2 sec-Perioden konnte konstant folgendes charakteristisches Verhalten beobachtet werden: Nach etwa 7 bis 13 sec — diese Variationsbreite bezieht sich wiederum in erster Linie auf das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Tiere — sinkt die Hippocampusfrequenz auf 4,5 Hz, in vereinzelten Fällen sogar bis auf 4 Hz ab. Wenn diese kritische Frequenz (4—4,5 Hz) erreicht ist, zerfällt die regelmäßige Hippocampustätigkeit und geht in die normalerweise während der Ruhe des Tieres zu beobachtende unregelmäßige Tätigkeit über. In der achten 2 sec-Periode nach Beginn der proprioceptiven Reizung war, wenn überhaupt noch eine regelmäßige Hippocampustätigkeit vorhanden war, nur eine solche von 4,5 Hz zu beobachten (s. Abb. 2). Der Hippocampus scheint somit beim normalen Kaninchen eine regelmäßige Tätigkeit unter 4—4,5 Hz nicht aufrecht erhalten zu können.

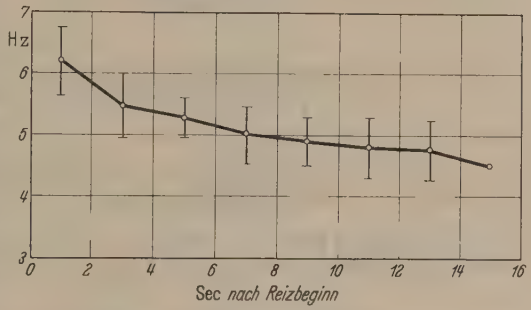


Abb. 2. Abnahme der Frequenz der Hippocampustätigkeit während und nach proprioceptiver Reizung. Abszisse: Zeit in Sekunden nach Reizbeginn; Ordinate: Hippocampusfrequenz in Hz. Dauer der Reizung: 5—7 sec. Mittelwerte und mittlere quadratische Abweichungen aus 32 Reizungen

Ein völlig gleichartiges Verhalten der Hippocampusfrequenz, wie es in Abb. 2 für proprioceptive Reizungen dargestellt ist, konnte auch während und nach retikulären und peripheren Reizungen festgestellt werden. Auch hier sank die initiale Hippocampusfrequenz noch während der Reizung ab und zeigte einen Zerfall, sobald sie die kritische Frequenz von 4—4,5 Hz erreicht hatte.

Bei den retikulären und peripheren Reizungen konnte nun weiters beobachtet werden, daß zwischen der initialen Hippocampusfrequenz (das ist die Frequenz innerhalb der ersten 2 sec-Periode nach Reizbeginn) und der bei der Reizung angewendeten Spannung eine positive Korrelation besteht. Abb. 3 zeigt zunächst das Verhalten der Hippocampusfrequenz desselben Tieres bei retikulären Reizungen mit verschiedener

Spannung. Zwischen dem Logarithmus der Spannung der Reizung und der initialen Hippocampusfrequenz konnte eine lineare Beziehung nachgewiesen werden. In Abb. 4 ist die an vier verschiedenen Tieren beobachtete Abhängigkeit der initialen Hippocampusfrequenz vom

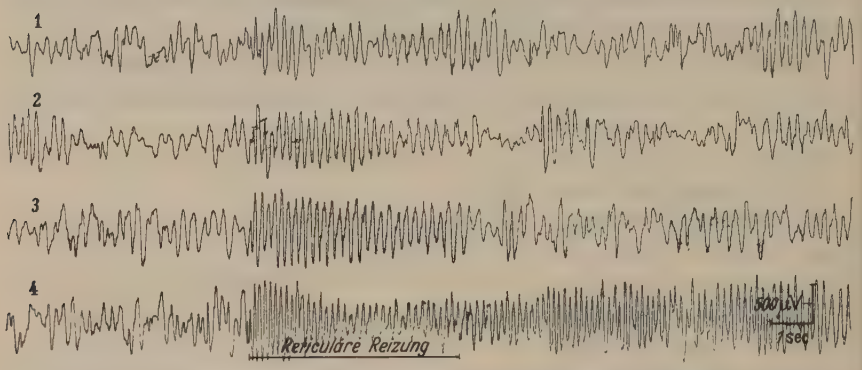


Abb. 3. Hippocampustätigkeit eines Kaninchens bei Reizung der Formatio reticularis des Mittelhirns mit verscheidenenen Spannungen, und zwar *1*: 0,9 V, *2*: 1,0 V, *3*: 1,2 V und *4*: 1,5 V. Beachte Zunahme der initialen Hippocampusfrequenz bei Reizung mit steigender Spannung

Logarithmus der Reizspannung zusammen mit den berechneten Regressionsgeraden eingetragen.

Mit Hilfe von Korrelationsanalysen (nach Linder[22]) konnten für diese vier Regressionsgeraden folgende Werte der Regressionskoeffizienten und der Bestimmtheitsmaße ermittelt werden:

Anzahl der Werte pro Tier *(n)*	Regressionskoeffizient *(b)*	Bestimmtheitsmaß *(B)*	*P(B)*
10	9,5	0,75	$0{,}01 > P > 0{,}001$
11	8,1	0,91	$P < 0{,}001$
11	9,9	0,93	$P < 0{,}001$
11	9,7	0,95	$P < 0{,}001$

Die Zahlen der obigen Tabelle sagen folgendes aus: 1. Bei Erhöhung der Spannung einer wirksamen retikulären Reizung um $\log V = 0{,}1$ (d. i. auf den 1,26fachen Wert) stieg die initiale Hippocampusfrequenz um 0,81—0,99 Hz an. 2. Bei den in Abb. 4 wiedergegebenen Versuchen lassen sich 75—95% der Streuung der initialen Hippocampusfrequenz aus Veränderungen der Reizspannung durch lineare Regression erklären. 3. Der Unterschied zwischen diesen Werten und dem Wert $B = 0$ ist statistisch gesichert ($P < 0{,}01$ bzw. $P < 0{,}001$). Wie aus Abb. 4 hervorgeht, ist diese Korrelation und insbesondere auch der Regressionskoeffizient unabhängig von der von Tier zu Tier variierenden Reizschwelle.

Ein völlig analoges Verhalten wurde auch bei peripheren Reizungen gefunden. Abb. 5 zeigt die lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Reizspannung und der initialen Hippocampusfrequenz.

Die diesen Korrelationen zugehörigen Werte für n, b, B und $P(B)$ betragen:

n	b	B	$P(B)$
5	5,2	0,89	$0{,}05 > P > 0{,}01$
7	3,7	0,97	$P < 0{,}001$
8	3,0	0,89	$P < 0{,}001$
12	2,8	0,66	$0{,}01 > P > 0{,}001$

Bei den peripheren Reizungen stieg somit die initiale Hippocampusfrequenz bei Erhöhung der Spannung einer wirksamen Reizung auf den 1,26fachen Wert um 0,28 bis 0,52 Hz an. Die gefundenen linearen Korrelationen sind wiederum statistisch gesichert.

Wir können keine Aussage darüber machen, innerhalb welches Bereiches eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Reizspannung und der initialen Hippocampusfrequenz besteht. Sicherlich sind jedoch die in den Abb. 4 u. 5 eingezeichneten höchsten Frequenzen nicht die höchst möglichen. Die höchste bisher von uns beobachtete initiale Hippocampusfrequenz bei einer starken retikulären Reizung betrug 11 Hz und lag noch im linearen Bereich der beschriebenen Korrelation.

2. Effekte der einzelnen Substanzen. Die verwendeten Substanzen wurden zunächst in folgender Dosierung i.v. verabreicht:

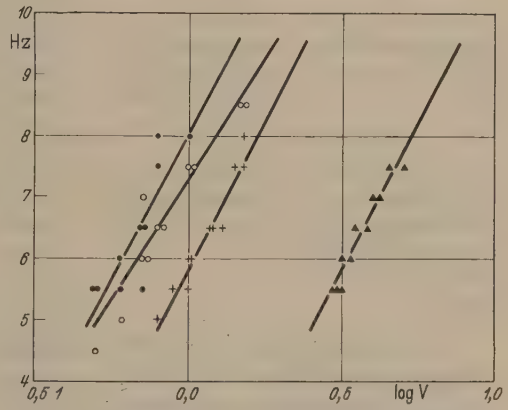


Abb. 4. Abhängigkeit der initialen Hippocampusfrequenz von der Reizspannung bei retikulärer Reizung. Abszisse: Logarithmus der Spannung; Ordinate: Hippocampusfrequenz in Hz. Werte von 4 verschiedenen Tieren. Regressionskoeffizienten und Bestimmtheitsmaße s. Text

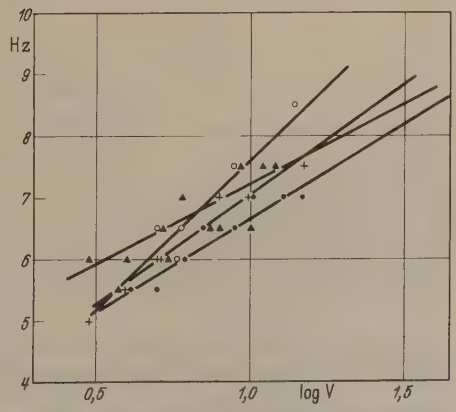


Abb. 5. Abhängigkeit der initialen Hippocampusfrequenz von der Reizspannung bei Reizung des M. gastrocnemius. Koordinaten wie in Abb. 4. Werte von 4 verschiedenen Tieren. Regressionskoeffizienten und Bestimmtheitsmaße s. Text

0,25 mg/kg Physostigmin, 20 mg/kg Methylamphetamin und 0,1 mg/kg LSD. Abb. 6 zeigt typische Ausschnitte aus EEG-Kurven, die bei diesen Versuchen gewonnen wurden.

Die in Abb. 6 wiedergegebenen EEG-Kurven wurden 5—10 min nach der Applikation der einzelnen Substanzen registriert. Die wesentlichen Unterschiede in der Wirkung der genannten Substanzen auf die bioelektrische Tätigkeit des Hippocampus lassen sich kurz wie folgt zusammenstellen:

	Physostigmin	Methylamphetamin	LSD
Hippocampustätigkeit bei Ruhe des Tieres	Außerordentlich regelmäßiger, hoher (bis 0,5 mV) 5 bis 5,5 Hz-Rhythmus	Unregelmäßigerer 4—5 Hz-Rhythmus, häufig überlagert von schnelleren Frequenzen	Unregelmäßige, niedrige, hochfrequente Tätigkeit
Hippocampustätigkeit bei Spontanbewegungen des Tieres, gelegentlich auch ohne solche auftretend	Frequenzzunahme auf etwa 6—6,5 Hz, völlig regelmäßig	Kein Effekt oder vorübergehender Zerfall der Tätigkeit	Regelmäßiger, hoher Rhythmus (etwa 5 Hz)

Es bestehen somit in der Wirkung der genannten Substanzen auf die Hippocampustätigkeit eindeutige und charakteristische Unterschiede. Auf die Tätigkeit des präzentralen Cortex wirkten alle drei Substanzen im Sinne einer Frequenzzunahme und Amplitudenabnahme, die jedoch

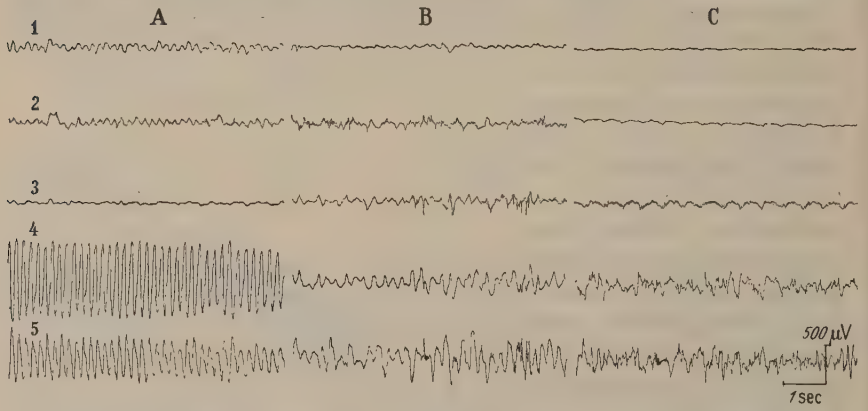


Abb. 6. Kaninchen-EEG. Ableitungen wie in Abb. 1. *A* Nach 0,25 mg/kg Physostigmin; *B* Nach 20 mg/kg Methylamphetamin; *C* Nach 0,1 mg/kg LSD. Gleiche Verstärkung in allen Teilen der Abbildung

bei Physostigmin und LSD meist stärker ausgeprägt war als bei Methylamphetamin. Im parieto-occipitalen Cortex war im allgemeinen ein mit der Hippocampustätigkeit synchroner, allerdings wesentlich niedrigerer

Grundrhythmus nachweisbar; dieser Grundrhythmus war nach Physostigmin-Verabreichung deutlicher ausgeprägt als nach der Applikation von Methylamphetamin. Nach LSD-Verabreichung konnten im parieto-occipitalen Cortex (und im Caput nuclei caudati) gelegentlich kurzdauernde (etwa 2 sec) Perioden eines regelmäßigen hohen 3,5—4 Hz-Rhythmus beobachtet werden, der zur Hippocampustätigkeit keine Beziehungen erkennen ließ. Wenn im Hippocampus eine auch nur halbwegs regelmäßige Tätigkeit nachzuweisen war, dann zeigte diese, unabhängig von der auslösenden Ursache, die gleiche bipolare Phasenumkehr wie nach proprioceptiver, retikulärer oder peripherer Reizung.

Die gegenseitige Beeinflussung der Wirkung der genannten Pharmaka auf die Hippocampustätigkeit wurde bisher nur orientierend untersucht. Immerhin konnte festgestellt werden, daß unter der Einwirkung von LSD (0,1 mg/kg) die durch Physostigmin-Verabreichung (0,25 mg/kg) ausgelöste regelmäßige Hippocampustätigkeit weitgehend desynchronisiert wird.

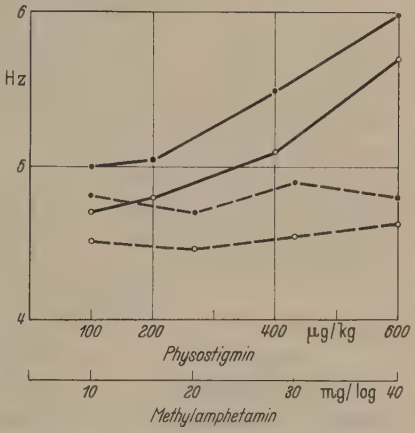


Abb. 7. Abhängigkeit der Hippocampusfrequenz von der Physostigmin- bzw. Methylamphetamin-Dosis. Abszisse: Dosis; Ordinate: Hippocampusfrequenz in Hz. ——— Physostigmin; - - - - - - - - - - - Methylamphetamin. Statistische Auswertung s. Varianzanalyse I und II

Da auf Grund der oben wiedergegebenen Versuchsergebnisse die Möglichkeit bestand, daß eine unterschiedliche Beeinflussung der Hippocampustätigkeit durch Physostigmin und Methylamphetamin nur durch die gewählte Dosierung vorgetäuscht wurde, haben wir in weiteren Versuchen die Veränderungen der Hippocampustätigkeit bei verschiedener Dosierung von Physostigmin bzw. Methylamphetamin untersucht. Die Tiere erhielten in 10 min-Intervallen je 10 mg/kg Methylamphetamin bzw. — ebenfalls in 10 min-Intervallen — nach zwei anfänglichen Dosen von je 0,1 mg/kg je 0,2 mg/kg Physostigmin. Physostigmin wurde bis zu einer Gesamtdosis von 0,6 mg/kg, Methylamphetamin bis zu einer solchen von 40 mg/kg gegeben; diese Methylamphetamin-Gesamtdosis überlebten die Tiere im allgemeinen nicht länger als etwa 10 min. Abb. 7 zeigt das Ergebnis von 4 typischen derartigen Versuchen: 2 Tiere hatten Gesamtdosen von 0,1, 0,2, 0,4 u. 0,6 mg/kg Physostigmin, 2 andere solche von 10, 20, 30 u. 40 mg/kg Methylamphetamin erhalten. Jeder der in Abb. 7 eingezeichneten Werte stellt einen Mittelwert aus je 20 unmittelbar aufeinanderfolgenden 2 sec-Perioden dar, die jeweils genau

5 min nach der Zufuhr der betreffenden Dosis ausgezählt wurden. Wie Abb. 7 zeigt, steigt unter Physostigmin die regelmäßige Hippocampusfrequenz mit zunehmender Dosis an, während sie unter Methylamphetamin unabhängig von der Dosierung und auch nach Verabreichung der letalen Gesamtdosis zwischen 4,4 und 5 Hz schwankt.

Die in Abb. 7 dargestellten Abhängigkeiten zwischen der Physostigmin- bzw. Methylamphetamin-Dosis und der Hippocampusfrequenz wurden mit Hilfe von Varianzanalysen statistisch ausgewertet. Diese Varianzanalysen lieferten folgende Ergebnisse:

Varianzanalyse I (Physostigmin)

Streuung	Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate	Mittleres Abweichungsquadrat
Dosen	3	27,8375	9,2792
Tiere	1	3,3063	3,3063
Dosen × Tiere	3	0,2062	0,0687
Rest	152	15,9250	0,1048
Gesamt	159	47,2750	

Varianzanalyse II (Methylamphetamin)

Streuung	Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate	Mittleres Abweichungsquadrat
Dosen	3	0,9545	0,3182
Tiere	1	2,3760	2,3760
Dosen × Tiere	3	0,2435	0,0812
Rest	152	32,5120	0,2139
Gesamt	159	36,0860	

Aus den obigen Varianzanalysen geht zunächst hervor, daß die beiden Wechselwirkungen Dosen × Tiere nicht signifikant sind; das bedeutet, daß die einzelnen Gesamtdosen bei den verschiedenen Tieren die Hippocampusfrequenz nicht in signifikant verschiedener Weise beeinflußten. Es kann daher in beiden Varianzanalysen die Summe der Abweichungsquadrate der Wechselwirkung mit der Summe der Abweichungsquadrate der Reststreuung vereinigt werden; es wurden auf diese Weise neue Reststreuungen erhalten, und zwar 0,1041 für Physostigmin und 0,2113 für Methylamphetamin, somit Werte, die sich von den oben angegebenen praktisch nicht unterscheiden. Ein Vergleich des Tiere- und Dosen-Durchschnittsquadrates mit der zugeordneten Reststreuung zeigt nun, daß sowohl bei den Physostigmin-, als auch bei den Methylamphetamin-Versuchen die beiden Tiere unter der Einwirkung dieser Substanzen signifikant verschiedene ($P < 0{,}001$) Hippocampusfrequenzen aufwiesen. Ein statistisch gesicherter Unterschied in der Wirkung der verschiedenen Dosen auf die Hippocampusfrequenz läßt sich jedoch nur bei Physostigmin ($P < 0{,}001$), nicht hingegen bei Methylamphetamin ($P > 0{,}2$) nachweisen.

Als Ergebnis der obigen Berechnungen kann somit zusammenfassend festgestellt werden, daß nach Physostigmin-Verabreichung die Hippocampusfrequenz

mit zunehmender Dosierung signifikant ansteigt, nach Methylamphetamin-Verabreichung hingegen nicht.

Ein Vergleich der beiden Reststreuungen ergibt, daß die Reststreuung (Methylamphetamin) mit $F = 2{,}05$ signifikant größer ist als die Reststreuung (Physostigmin), ein Befund, der auf die bereits erwähnte Tatsache hinweist, daß die Hippocampusfrequenz innerhalb von 20 aufeinanderfolgenden 2 sec-Perioden nach einer bestimmten Methylamphetamin-Dosis wesentlich unregelmäßiger ist, als nach einer bestimmten Physostigmin-Dosis. Beweisend ist dieses Resultat indessen nicht, da die Physostigmin-Versuche an anderen Tieren durchgeführt wurden als die Methylamphetamin-Versuche.

Um zu prüfen, ob sich die Hippocampusfrequenz durch hohe Physostigmin-Dosen in gleicher Weise wie durch starke retikuläre oder periphere Reizungen bis auf etwa 11 Hz steigern läßt, wurden in einigen Versuchen Physostigmin bis zu Gesamtdosen von 1,2—1,4 mg/kg verabreicht. Hierbei zeigte es sich, daß eine Frequenz von etwa 6—7 Hz die maximal mögliche Hippocampusfrequenz unter der Einwirkung von Physostigmin zu sein scheint. Wurde nach dem Erreichen dieser Frequenz die Physostigmin-Dosis weiter gesteigert, so blieb die Hippocampusfrequenz im allgemeinen praktisch unverändert; gelegentlich konnte hierbei jedoch auch eine Tendenz zur Frequenzabnahme beobachtet werden.

Diskussion

Physostigmin, das dem Methylamphetamin chemisch und wirkungsmäßig sehr nahe stehende Amphetamin und LSD bewirken eine Desynchronisierung der bioelektrischen Tätigkeit des präzentralen Cortex (Bradley[4], Bradley u. Elkes[5, 6], Elkes et al.[9], Hiebel et al.[16]). Die Frage, ob dieser Effekt durch eine Erregung des ascendierenden retikulären Aktivierungssystems nach Moruzzi u. Magoun[31] zustande kommt, ist nur teilweise geklärt. Bonvallet, Dell u. Hiebel[3] halten Adrenalin für den physiologischen Aktivator dieses Systemes und auch nach der Ansicht von Bradley[4] ist ein adrenerger Stoff, nämlich Amphetamin, als spezifischer Erregerstoff des ascendierenden retikulären Aktivierungssystems zu bezeichnen. Andererseits vertreten vor allem Rinaldi u. Himwich[35, 36], sowie Longo[23, 24] die Ansicht, daß der „arousal reaction" ein cholinerger Mechanismus zugrunde liegt. Auf Grund umfangreicher Untersuchungen kommen schließlich Marrazzi u. Mitarb.[15, 25–29] zu dem Schluß, daß sich die humorale Reizübertragung im ZNS nicht prinzipiell von der Reizübertragung an peripheren autonomen Ganglien bzw. an der neuromuskulären Endigung unterscheide. So finden die genannten Autoren, daß die synaptische Übertragung im ZNS durch cholinerge Pharmaka aktiviert und durch adrenerge Pharmaka (Adrenalin, Noradrenalin, Ephedrin, Amphetamin), sowie durch Atropin, d-Tubocurarin, Tetraäthylammonium, Mezkalin und durch Acetylcholin in hoher Dosierung blockiert wird. Diese Untersuchungen wurden allerdings nur am

optischen und teilweise auch am akustischen Cortex der Katze durchgeführt und müssen daher nicht unbedingt auch für die synaptische Übertragung im Bereich des ascendierenden retikulären Aktivierungssystemes Gültigkeit besitzen. Immerhin handelt es sich nach Chang[7, 8] sowohl bei den Synapsen des optischen Cortex, als auch bei denen der retikulären Formation um Synapsen des axodendritischen (paradendritischen) Typs, denen nach Purpura[33] gemeinsame bioelektrische Eigenschaften zuzuschreiben sind. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen schließlich auch Purpura u. Grundfest[34]. Diese Autoren konnten zeigen, daß depolarisierende Substanzen wie Acetylcholin „Synapsenaktivatoren", nicht depolarisierende Kompetitoren wie d-Tubocurarin hingegen „Synapseninaktivatoren" sind, wobei sich allerdings periphere und zentrale Synapsen nicht immer völlig identisch verhalten.

Unsere Untersuchungen haben nun gezeigt, daß zwischen der Frequenz der vor allem von Jung u. Kornmüller[19], sowie von Green u. Arduini[12, 13] beschriebenen, im Rahmen einer „arousal reaction" auftretenden, regelmäßigen Hippocampusfrequenz und der Intensität der Reizung eine signifikante positive Korrelation besteht. Andererseits konnte festgestellt werden, daß eine cholinerge Substanz, nämlich Physostigmin, ebenfalls eine regelmäßige Hippocampustätigkeit bewirkt, deren Frequenz mit einer Erhöhung der Dosis signifikant ansteigt, während unter der Einwirkung von Methylamphetamin der Hippocampus eine unregelmäßigere und nicht dosisabhängige Frequenz aufweist. Wir möchten betonen, daß unsere Untersuchungen keinen Beitrag zur Klärung der an sich sehr interessanten Frage darstellen sollen, warum eine Erregung des ascendierenden retikulären Aktivierungssystems im Neocortex zu einer Desynchronisierung, im Paleocortex hingegen zu einer Synchronisierung der bioelektrischen Tätigkeit führt; wir glauben lediglich, daß die Hippocampustätigkeit ein besserer, weil quantitativ leichter auswertbarer Indicator des Erregungszustandes des ascendierenden retikulären Aktivierungssystemes ist als etwa die Tätigkeit des präzentralen Cortex. Vergleicht man nun die Hippocampustätigkeit bei peripherer oder retikulärer elektrischer Reizung — d. h. also bei einem sicher vorliegenden Erregungszustand des ascendierenden retikulären Aktivierungssystemes — mit der Hippocampustätigkeit unter dem Einfluß von Physostigmin bzw. Methylamphetamin, so zeigt sich, daß sicherlich zwischen dem Effekt einer Reizung und dem einer Physostigmin-Applikation eine erheblich größere Ähnlichkeit besteht als zwischen dem Effekt einer Reizung und dem einer Methylamphetamin-Applikation. Wenn auf Grund einer reinen Analogie überhaupt ein Rückschluß auf den Funktionsmechanismus des ascendierenden retikulären Aktivierungssystems gezogen werden darf, dann wohl der, daß eine cholinerge Reizübertragung zumindest sehr wahrscheinlich ist. Auffällig war nun der

Befund, daß sich die Hippocampusfrequenz durch starke Reizungen bis auf etwa 11 Hz und möglicherweise noch höher steigern läßt, unter der Einwirkung von Physostigmin jedoch nur auf maximal 6—7 Hz; unter der Einwirkung sehr hoher Physostigmin-Dosen scheint es eher wieder zu einem Absinken der Hippocampusfrequenz zu kommen. Es besteht hier vielleicht ebenfalls eine Analogie zu den Befunden von Marrazzi[25] und Marrazzi u. King[29], wonach Acetylcholin die synaptische Übertragung im optischen Cortex in niedriger Dosierung aktiviert, in hoher Dosierung hingegen blockiert. Wenn nun eine Blockierung der Synapsen zu einer Abnahme der Hippocampusfrequenz führt, könnte man sich vorstellen, daß die niedrige Hippocampusfrequenz, die wir unter der Einwirkung von 10—40 mg/kg Methylamphetamin beobachten konnten, durch eine Hemmung der synaptischen Übertragung bedingt ist. Wie bereits erwähnt, ist ja Amphetamin nach Marrazzi[25] als zentraler Synapsenblocker zu bezeichnen. Ungeklärt bleibt bei diesen Überlegungen freilich die Frage, wo diese Synapsen, durch deren pharmakologische Beeinflussung die von uns beobachteten Veränderungen der Hippocampustätigkeit zustande kommen, lokalisiert zu denken wären.

Die Wirkung von LSD auf die Hippocampustätigkeit erwies sich in unseren Versuchen als prinzipiell verschieden von der des Physostigmin und Methylamphetamin. LSD bewirkte nicht nur keine regelmäßige, hohe Hippocampustätigkeit, sondern war auch imstande, eine solche, durch Physostigmin ausgelöste Tätigkeit zu desynchronisieren. LSD wirkt zwar ebenso cortical desynchronisierend wie Physostigmin und Amphetamin, jedoch weisen schon die Durchschneidungsversuche von Bradley[4], Bradley u. Elkes[5] und von Elkes, Elkes u. Bradley[9] auf eine völlig andersartigen Wirkungsmechanismus hin. Nach Ingvar u. Söderberg[17] wirkt LSD nicht auf das ascendierende retikuläre Aktivierungssystem, sondern vorwiegend auf den Cortex. Nach Purpura[33] handelt es sich bei der durch LSD ausgelösten Amplitudenverringerung der corticalen Aktivität um keine „arousal reaction"; vielmehr sei dieser Effekt dadurch zu erklären, daß LSD die Summation von Dendritenpotentialen verhindert. Die mit Makroelektroden abgeleiteten langsamen Potentialschwankungen des Gehirns stellen ja nach der Ansicht von Bishop u. Clare[2], sowie von Tasaki, Polley u. Orrego[39] summierte Dendritenpotentiale dar. Die Wirkung von LSD auf die normale und durch Physostigmin veränderte Hippocampustätigkeit könnte in der gleichen Weise gedeutet werden. Es müßte in diesem Fall angenommen werden, daß die Beeinflussung der Hippocampustätigkeit durch LSD nicht durch eine Wirkung dieser Substanz auf das ascendierende retikuläre Aktivierungssystem, sondern auf die nervösen Elemente im Hippocampus selbst zustande kommt.

Nach Marrazzi u. Hart[28] hemmt LSD die synaptische Übertragung im optischen Cortex der Katze und wirkt damit prinzipiell gleichartig wie Amphetamin. Der scheinbare Widerspruch dieses Befundes zu unseren Versuchsergebnissen scheint indessen lediglich darauf hinzuweisen, daß aus der Wirkung einer Substanz auf eine bestimmte zentralnervöse Struktur keine allzu weittragenden Schlüsse auf die wahrscheinlich äußerst komplexe Wirkung dieser Substanz auf das gesamte ZNS gezogen werden dürfen.

Zusammenfassung

Es wurde die bioelektrische Tätigkeit des dorsalen Rhinencephalons (Hippocampus) des wachen, nicht curarisierten Kaninchens unter der Einwirkung von verschiedenen Reizungen und Pharmaka untersucht. Es wurden dabei folgende Befunde erhoben:

1. Die „arousal reaction" ist im Hippocampus durch eine regelmäßige, hohe Tätigkeit charakterisiert.

2. Zwischen der initialen Frequenz dieser Tätigkeit und der Intensität des auslösenden Reizes besteht eine signifikante positive Korrelation. Noch während des Reizes sinkt die Frequenz allmählich ab.

3. Physostigmin verursacht ebenfalls eine hohe, regelmäßige Tätigkeit im Hippocampus. Die Frequenz dieser Tätigkeit nimmt mit steigender Physostigmin-Dosis zu, überschreitet jedoch niemals ein Maximum von etwa 6—7 Hz.

4. Unter der Einwirkung von Methylamphetamin wird im Hippocampus eine etwas unregelmäßigere und langsamere Tätigkeit ausgelöst, deren Frequenz von der Methylamphetamin-Dosis unabhängig ist.

5. Nach LSD-Verabreichung zeigt der Hippocampus eine niedrige, unregelmäßige und höherfrequente Tätigkeit.

Die Analogie zwischen dem Effekt einer peripheren oder retikulären Reizung und der Physostigminwirkung auf die Hippocampustätigkeit scheint ein weiterer Hinweis für den cholinergen Mechanismus des ascendierenden retikulären Aktivierungssystems zu sein.

Wir danken der Sandoz A. G., Basel, für die Überlassung der nötigen Versuchsmengen LSD.

Literatur

[1] Andy, O., and M. Akert: Electroencephalog. Clin. Neurophysiol. **5**, 320 (1953). — [2] Bishop, G. H., and M. H. Clare: Electroencephalog. Clin. Neurophysiol. **4**, 321 (1952). — [3] Bonvallet, M., P. Dell and G. Hiebel: Electroencephalog. Clin. Neurophysiol. **6**, 119 (1954). — [4] Bradley, P. B.: Electroencephalog. Internat. III. Congreß p,. 21, 1953. — [5] Bradley, P. B., and J. Elkes: J. of Physiol. **120**, 13 P (1953). — [6] Bradley, P. B., and J. Elkes: J. of Physiol. **120**, 14 P (1953). — [7] Chang, H. T.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **17**, 189 (1952). — [8] Chang, H. T.: J. of Neurophysiol. **16**, 117 (1953). — [9] Elkes, J., C. Elkes and P. B. Bradley: J. Ment. Sci. **100**, 125 (1954). — [10] Gangloff, H.,

u. M. Monnier: Pflügers Arch. **261**, 421 (1955). — [11] Gangloff, H., and M. Monnier: Electroencephalog. Clin. Neurophysiol. **8**, 623 (1956). — [12] Green, J. D., and A. Arduini: 19. Internat. Physiol. Congr., Montreal, 1953. — [13] Green, J. D., and A. Arduini: J. of Neurophysiol. **17**, 533 (1954). — [14] Green, J. D., and X. Machne: Amer. J. Physiol. **181**, 219 (1955). — [15] Hart, E. R., and A. S. Marrazzi: Federat. Proc. **12**, 329 (1953). — [16] Hiebel, G., M. Bonvallet, P. Huve et P. Dell: Semaine Hôp. **1954**, 1880. — [17] Ingvar, D. H., u. U. Söderberg: Experientia (Basel) **12**, 427 (1956). — [18] Jung, R.: Arch. f. Psychiatr. **183**, 206 (1950). — [19] Jung, R., u. A. E. Kornmüller: Arch. f. Psychiatr. **109**, 1 (1939). — [20] Kaada, B. R.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **23**, Suppl. 83 (1951). — [21] Liberson, W. T., et J. Cadilhac: Montpellier médical **6**, 515 (1954). — [22] Linder, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure, 2. Aufl. Basel: Birkhäuser 1951. — [23] Longo, V. G.: Experientia (Basel) **11**, 76 (1955). — [24] Longo, V. G.: J. of Pharmacol. **116**, 198 (1956). — [25] Marrazzi, A. S.: Arzneimittelforsch. **3**, 388 (1953). — [26] Marrazzi, A. S., and E. R. Hart: Federat. Proc. **9**, 85 (1950). — [27] Marrazzi, A. S., and E. R. Hart: J. of Pharmacol. **103**, 353 (1951). — [28] Marrazzi, A. S., and E. R. Hart: Science **121**, 365 (1955). — [29] Marrazzi, A. S., and E. E. King: Amer. J. Physiol. **163**, 732 (1950). — [30] Monnier, M., u. H. Laue: Helvet. physiol. Acta **11**, 73 (1953). — [31] Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Electroencephalog. Clin. Neurophysiol. **1**, 455 (1949). — [32] Petsche, H., u. M. Monnier: Helvet. physiol. Acta **12**, 123 (1954). — [33] Purpura, D. P.: A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat. **75**, 132 (1956). — [34] Purpura, D. P., and H. Grundfest: J. of Neurophysiol. **19**, 573 (1956). — [35] Rinaldi, F., and H. E. Himwich: A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat. **73**, 387 (1955). — [36] Rinaldi, F. and H. E. Himwich: A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat. **73**, 396 (1955). — [37] Rose, M.: J. of Psychol. **43**, 353 (1931). — [38] Sawyer, C. H., J. W. Everett and J. D. Green: J. Comp. Neur. **101**, 801 (1954). — [39] Tasaki, I., E. H. Polley and E. Orrego: J. of Neurophysiol. **17**, 454 (1954).

Dr. S. Sailer, Pharmakologisches Institut d. Univ. Wien/Österreich

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 78—90 (1957)

Aus der Pharmakologischen Abteilung (Direktor: Prof. B. Uvnäs) und der Hals-Nasen-Ohrenklinik (Direktor: Prof. T. Skoog) des Karolinska Institutes in Stockholm

Die Wirkung von Acetyl-β-Methylcholinjodid (MeCh) auf die Skeletmuskeldurchblutung des Menschen

Von

Herman Diamant, Klaus Graf und Bo Holmstedt

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. März 1957)

Acetyl-β-Methylcholinjodid (MeCh) ist ein synthetischer Cholinester, dessen pharmakologische Eigenschaften denen des Acetylcholins sehr ähnlich sind. Es bestehen daher ausgeprägte Wirkungen auf die Blutzirkulation. Stets erfolgt bei i.v. MeCh-Infusion ein geringer Abfall des mittleren Blutdrucks, während gleichzeitig die Haut eine massive Rötung, also Mehrdurchblutung, zeigt. Dagegen ist das Verhalten der Muskeldurchblutung unter MeCh noch unbekannt. Die einfache Annahme einer Muskelmehrdurchblutung, wie sie im Tierversuch durch Acetylcholin ausgelöst werden kann, erscheint nicht berechtigt, da von Rein[29] im Tierversuch sowie von Barcroft, Bock, Hensel u. Kitchin[5] und Hensel, Ruef u. Golenhofen[20] auch beim Menschen häufig ein gegensätzliches Verhalten von Haut- und Muskeldurchblutung gefunden wurde. Eine fortlaufende Beobachtung der Muskeldurchblutung des Menschen unter dem Einfluß von MeCh und damit also während einer mächtig gesteigerten Hautdurchblutung konnte deshalb für die Erörterung der Beziehungen zwischen Haut- und Muskelgefäßreaktionen wie auch für die Diskussion des noch in mancher Weise unklaren Wirkungsmechanismus der acetylcholinverwandten Stoffe von Interesse sein.

Methodik

Bei 7 kreislaufgesunden Männern im Alter von 20—61 Jahren wurde während mehrerer Stunden die *Durchblutung* im M. Gastrocnemius mit der Wärmeleitsonde nach Hensel[19] fortlaufend registriert und dabei 4—7 mal MeCh i.v. infundiert. Die Infusionen erfolgten durch eine Präzisionsapparatur und dauerten 5 min. In 2 Fällen wurde 7 min lang infundiert. In allen Fällen war die infundierte Dosis mit 0,40 mg/min gleich groß. Verwandt wurde das Präparat „Betacholyl"*.

Die Versuchspersonen lagen während des Experiments auf einem weichen Untersuchungsbett. Die Beine, insbesondere Kniekehle und Ferse des zur Durchblutungsmessung benutzten Beines, waren mit Baumwolle bequem unterpolstert und gegen Wärmeverlust ausreichend abgedeckt. Die Raumtemperatur betrug 22° C.

* Hersteller: Vitrum A.B., Stockholm.

Die Wärmeleitsonde ist zusammen mit ihren methodischen Einzelheiten bereits früher häufiger eingehend beschrieben worden, weshalb bezüglich der näheren Daten und Verwendungsmöglichkeiten auf diese Publikationen verwiesen sei (Hensel, Ruef u. Golenhofen[19], Hensel u. Bock[22], Golenhofen, Hensel u. Hildebrandt[14]). Gemessen wird die Wärmeleitzahl des Muskels, welche sich annähernd proportional zum Stromzeitvolumen der Muskeldurchblutung ändert. Die Wärmeleitzahl ist jedoch kein Maß für die Absolutgröße der Durchblutung. Aus der Abnahme der Wärmeleitzahl bei arterieller Drosselung kann die relative Größe der Ruhedurchblutung ersehen werden, von der aus die Durchblutungsänderungen in Prozent der Ruhedurchblutung geeicht werden. Die einzelnen Sondenlagen wurden in unseren Versuchen jeweils durch art. Drosselung mittels pneumatischer Manschette bei ungeheizter wie bei geheizter Sondenspitze auf Brauchbarkeit geprüft (Golenhofen, Hensel u. Hildebrandt[14]). Alle Reaktionen, die bei geheizter Sondenspitze von deutlichen Temperaturveränderungen begleitet waren, wurden bei ungeheizter Sonde wiederholt, um auf diese Weise die Wärmeleitzahlmessung störende Schwankungen des Temperaturgradienten erkennen und durch Änderung der Sondenlage beseitigen zu können. Mit dem eigentlichen Experiment wurde erst dann begonnen, wenn größere Temperaturgradientenänderungen bei ungeheizter Sonde nicht mehr feststellbar waren (Abb. 3B). Im Durchschnitt unserer Versuche erwies sich immer erst jede fünfte Sondenlage als brauchbar.

Die Registrierung der Temperaturdifferenzen der Wärmeleitsonde erfolgte über ein Spiegelgalvanometer*, welches ein direktschreibendes Gerät zur sofort sichtbaren, beliebig langdauernden und kontinuierlichen Aufzeichnung der Galvanometerausschläge steuerte**. Die Einstellzeit des gesamten Registriersystems betrug 10 sec.

Um das Verhalten der Muskeldurchblutung unter MeCh mit den bereits bekannten MeCh-Wirkungen vergleichen zu können, wurden ferner die folgenden Größen gemessen:

1. Die *Salivation* der linken Glandula parotis mit einem fortlaufend registrierenden Tropfenzähler. Verwandt wurde ein „Sialometer" nach Krasnogorski[24]. Es besteht aus einer runden Kammer von etwa 1—2 cm^2 Grundfläche, welche den gebildeten Speichel aufnimmt. Der Rand dieser Kammer enthält mehrere kleine Sauglöcher, in denen durch eine Saugpumpe ein Unterdruck von etwa 20 mm Hg erzeugt wird. Mit dieser Saugvorrichtung wird das Gerät an der Mundschleimhaut über der Öffnung des Ductus paroticus angebracht. Der in die Auffangkammer ausgetretene Speichel fließt durch einen Polyäthylenkatheter in eine unter der Versuchsperson aufgestellte Tropfkammer, in der jeder Tropfen mittels einer photoelektrischen Apparatur registriert (Lindgren u. Uvnäs[25]) und fortlaufend kymographisch aufgezeichnet wird (Näheres siehe Diamant, Diamant u. Holmstedt[7]).

2. Die *Herzfrequenz*, ermittelt aus dem fortlaufend mit einem Direktschreiber*** registrierten EKG.

3. Der *arterielle Blutdruck* auskultatorisch am Oberarm.

Ergebnisse

1. MeCh-Infusion am unbeeinflußten Menschen

a) Das Verhalten von Salivation, Blutdruck und Herzfrequenz. 30 bis 90 sec nach Beginn der i.v. Infusion von 0,40 mg/min MeCh setzte eine profuse Salivationssteigerung ein. Die Salivation der linken Glandula

* Hersteller: Cambridge CO Ltd., England.

** Nachlaufschreiber der Fa. Dr. B. Lange, Berlin.

*** Mingograph der Fa. Elema A.B., Stockholm.

parotis, bis dahin nicht meßbar, erreichte gewöhnlich Werte bis zu 40 Tropfen pro Minute (etwa 2,0 ml/min). Der abgegebene Speichel war dünnflüssig. Der mittlere arterielle Blutdruck begann zu gleicher Zeit abzufallen, wobei der diastolische Druck stärker als der systolische Druck abnahm. Die Herzfrequenz stieg durchschnittlich um 30—50% des Ausgangswertes an. Gleichzeitig war eine plötzlich auftretende, sehr starke Rötung der Haut, vor allem im Bereich des Gesichtes, zu beobachten.

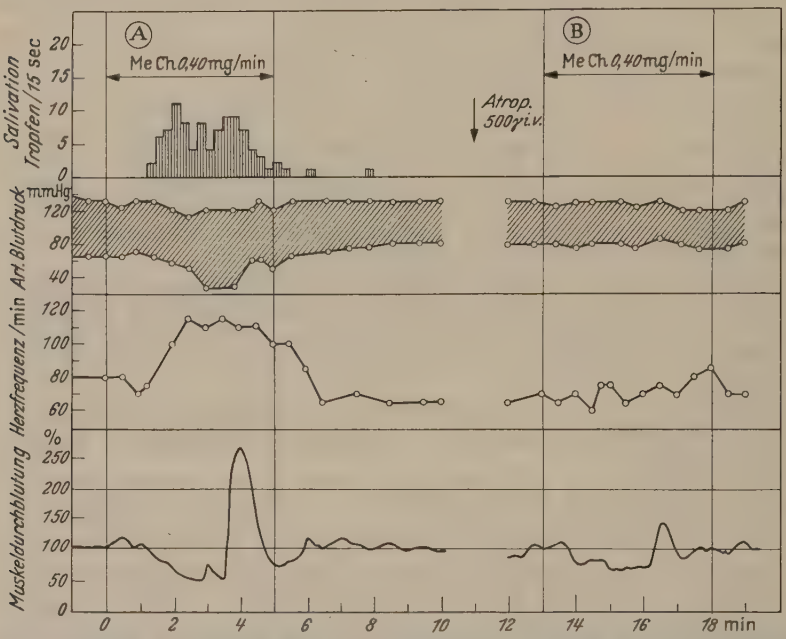


Abb. 1. Verhalten von Salivation der linken Glandula parotis, arteriellem Blutdruck, Herzfrequenz und Muskeldurchblutung im rechten M. Gastrocnemius während MeCh-Infusion, *A* vor, *B* nach 0,5 mg i.v. Atropinsulfat. (Weiteres s. Text)

Die Versuchspersonen gaben dabei an, daß sie am ganzen Körper ein starkes Wärmegefühl verspürten. Häufig wurde 2—3 min nach dem Beginn der MeCh-Wirkung, bei noch fortbestehender MeCh-Infusion, ein allmählich erfolgender Rückgang der Veränderungen von Salivation und Blutdruck beobachtet. Spätestens 3 min nach Beendigung der Infusion hatten die gemessenen Größen wieder die Ausgangswerte eingenommen. In Abb. 1 A ist das Verhalten dieser Größen in einem typischen Beispiel dargestellt. Diese Reaktionen von Salivation, Blutdruck und Herzfrequenz waren in allen Versuchen und im Einzelversuch auch während aller aufeinanderfolgenden MeCh-Infusionen immer die gleichen. Sie sind in dieser Form auch schon früher eingehend beschrieben worden (Diamant, Diamant u. Holmstedt[7]).

b) Das Verhalten der Skeletmuskeldurchblutung. Gleichzeitig mit dem Beginn der Salivationssteigerung, der Blutdruckabnahme, der Herzfrequenzsteigerung und der massiven Hautrötung fiel die Muskeldurchblutung allmählich auf ein niedrigeres Niveau von durchschnittlich 60% der Ruhedurchblutung ab. In einem weit auseinanderliegenden Zeitraum von wenigen Sekunden bis zu mehreren Minuten nach Erreichen dieses niedrigeren Niveaus stieg die Muskeldurchblutung plötzlich wieder sehr steil an und überschritt dabei oft den Wert der Ruhedurchblutung um mehrere 100%. Diese Durchblutungssteigerung bestand jedoch nur etwa 30 sec, um dann ebenso schnell wieder unter den Ruhedurchblutungswert abzufallen. Der anfängliche Minderdurchblutungswert wurde jetzt aber nicht mehr ganz erreicht. Nach Beendigung der MeCh-Infusion stieg die Muskeldurchblutung innerhalb von 2—5 min wieder auf den vorherigen Ruhedurchblutungswert an, in der gleichen Zeit etwa, in der auch die anderen gemessenen Größen wieder auf die Ausgangswerte zurückgingen. In Abb. 1 A ist auch das Verhalten der Muskeldurchblutung unter MeCh dargestellt. Man erkennt deutlich die anfängliche Abnahme der Muskeldurchblutung. Auffällig ist die dann plötzlich erfolgende starke Durchblutungssteigerung, die von keiner gleichzeitigen stärkeren Änderung der anderen gemessenen Größen begleitet ist.

Bei jeder MeCh-Infusion am unbeeinflußten Menschen (es wurden 38 MeCh-Infusionen bei 7 Versuchspersonen durchgeführt) wurde ohne Ausnahme dieses prinzipielle Verhalten der Muskeldurchblutung beobachtet. Für die weitere Beschreibung der Ergebnisse wird daher das Verhalten der Skeletmuskeldurchblutung während der i.v. MeCh-Infusion in 3 Phasen unterteilt: Eine *1. Phase* der Durchblutungsabnahme, eine *2. Phase* der plötzlichen, kurzfristigen Durchblutungszunahme und eine *3. Phase*, in welcher die Durchblutung wieder unter den Wert der Ruhedurchblutung absank, jedoch nicht mehr so tief wie in der 1. Phase. Die 3. Phase endete mit dem Ende der Infusion, wonach innerhalb von 2—5 min die Muskeldurchblutung wieder auf den Ausgangswert anstieg.

Die Durchblutungsgrößen (bezogen auf die Ruhedurchblutung als 100%) betrugen in der 1. Phase: 60 (30—95)%, in der 2. Phase: 200 (85—350)% und in der 3. Phase: 85 (55—100)%.

Während die 1. Phase immer zusammen mit dem Beginn der anderen MeCh-Wirkungen einsetzte, war der zeitliche Beginn der 2. Phase, auch bei aufeinanderfolgenden Infusionen bei derselben Versuchsperson und gleicher Sondenlage, durchaus nicht einheitlich. Im Mittel setzte die 2. Phase 105 sec nach Beginn der 1. Phase ein, wobei aber die Schwankungen von 50—310 sec nach Beginn der 1. Phase reichten. In 2 Fällen begann die 2. Phase sogar erst 10 sec bzw. 20 sec nach Beendigung der 5 min MeCh-Infusion — also mindestens 4 min nach dem Beginn der anderen MeCh-Reaktionen. Auch hier erfolgte jeweils ein plötzlicher

Durchblutungsanstieg (bis auf 180% der Ruhedurchblutung). Im Anschluß daran wurde in diesen beiden Fällen gleich wieder die Ruhedurchblutung eingenommen, so daß die 3. Phase einer noch teilweise verminderten Muskeldurchblutung hier nicht zu beobachten war.

In 3 Versuchen wurde mehrmals das Auftreten von 2—3 kurz hintereinander folgenden, plötzlichen Durchblutungssteigerungen im Verlauf *einer* 5 min MeCh-Infusion beobachtet. Zwischen diesen Reaktionen, die in einem zeitlichen Abstand von etwa 80 sec aufeinander folgten, fiel die Muskeldurchblutung wieder auf den Minderdurchblutungswert der 1. Phase ab. In 2 Fällen mit jeweils 2 solchen Durchblutungssteigerungen erreichten die jeweils zu einer Infusionsperiode gehörenden Reaktionen recht genau eine gleiche Höhe von 250—300% der Ruhedurchblutung. Die 2. Phase der plötzlichen Mehrdurchblutung der Muskulatur kann also innerhalb einer 5 min MeCh-Infusion unter Umständen mehrmals hintereinander auftreten.

In den weiteren Fällen mit mehreren Durchblutungsanstiegen ragte immer *eine* Durchblutungssteigerung mit erheblich stärkerer Anstiegssteilheit und größerer Amplitude gegenüber den anderen, nur selten den Wert der Ruhedurchblutung erreichenden Durchblutungszunahmen heraus. In diesen Fällen hatte aber bereits die Ruhedurchblutung Schwankungen gezeigt, deren Amplitude und Periodendauer recht genau den von Schoop u. Marx[30] sowie Golenhofen u. Hildebrandt[16] beschriebenen spontanrhythmischen Änderungen der Skeletmuskeldurchblutung entsprachen. Diese rhythmischen Änderungen sind ein physiologisches Phänomen und daher auch ohne Einfluß körperfremder Wirkstoffe zu finden. Die steilere und größere Mehrdurchblutung der 2. Phase war recht gut von solchen spontanen Durchblutungsschwankungen zu unterscheiden, von denen wir annehmen, daß sie auch während der MeCh-bedingten Minderdurchblutung der Muskulatur weiterbestanden.

2. MeCh-Infusion am atropinisierten Menschen

a) Das Verhalten von Salivation, Blutdruck und Herzfrequenz. Nach i.v. Gabe von 0,25—1,0 mg Atropinsulfat waren signifikante Änderungen von arteriellem Blutdruck, Herzfrequenz und Salivation während i.v. Infusionen von 0,40 mg/min MeCh nicht mehr festzustellen (Abb. 1B). Eine sichtbare Hautrötung trat nicht mehr auf. Wurde die genannte Menge Atropin erst während einer schon wirksamen MeCh-Infusion injiziert, so wurden dadurch alle die in Abschn. 1a beschriebenen MeCh-Effekte innerhalb von 30—60 sec ausgelöscht. Die sonst bei MeCh-Infusionen auftretenden Erscheinungen wie Hitzegefühl, Schweißausbruch, Oppressionsgefühl im Thorax, Lacrimation, Hyperpnoe usw. wurden von den atropinisierten Versuchspersonen nicht mehr angegeben.

Gleiche Ergebnisse hatten bereits die Untersuchungen von SIMONART[31], STARR[32] und DIAMANT, DIAMANT u. HOLMSTEDT[7] erbracht.

b) Das Verhalten der Skeletmuskeldurchblutung. Im Gegensatz zu der regelmäßig vollständigen Auslöschung der anderen beobachteten MeCh-Reaktionen (s. Abschn. 2a) wurden die als 1. und 2. Wirkungsphase beschriebenen MeCh-bedingten Veränderungen der Muskeldurchblutung durch i.v. Dosen von 0,25—1,0 mg Atropinsulfat nur selten beseitigt (Abb. 2). Sie erfuhren dagegen immer eine deutliche Verminderung

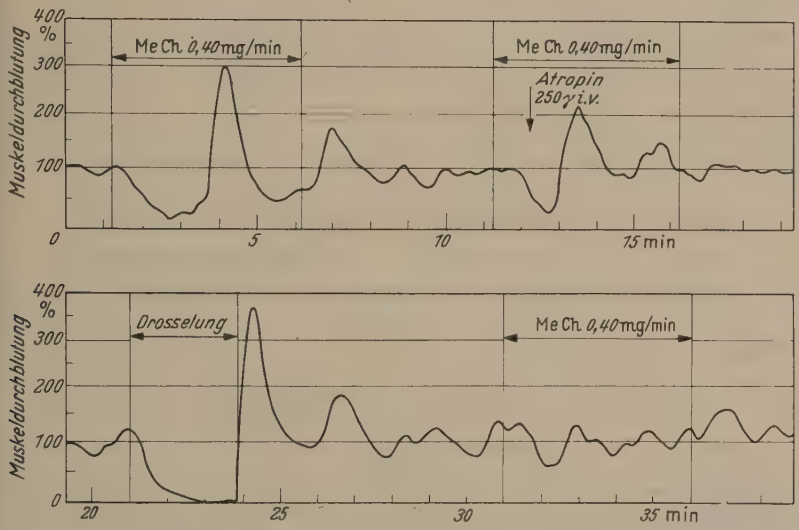


Abb. 2. Fortlaufende Registrierung der Durchblutung im rechten M. Gastrocnemius. Eichung in Prozent der Ruhedurchblutung. Die typischen Durchblutungsreaktionen während einer MeCh-Infusion werden durch 0,25 mg i.v. Atropinsulfat sofort deutlich vermindert. 19 min nach der Atropingabe bewirkt eine gleiche MeCh-Infusion keine von den spontanrhythmischen Schwankungen der Ruhedurchblutung mehr zu unterscheidende Änderung

(Abb. 1B, 3C u. 4). Nur 2 Versuchspersonen, die 0,5 bzw. 1,0 mg Atropinsulfat i.v. erhalten hatten, zeigten unter MeCh keine erkennbare Änderung der Muskeldurchblutung mehr. 5 Versuchspersonen dagegen, denen zuvor in 2 Fällen 0,25 mg, sonst ebenfalls 0,5 bzw. 1,0 mg Atropinsulfat i.v. injiziert worden war, wiesen noch immer eine geringe Minderdurchblutung in der 1. Phase und einen deutlich erkennbaren plötzlichen Durchblutungsanstieg in der 2. Phase der MeCh-Wirkung auf. Die 3. Phase nochmaliger Durchblutungsverminderung war am atropinisierten Menschen nur noch selten und dann als erheblich reduziert zu beobachten (Abb. 1B). Wurde Atropin erst während einer bereits wirksamen MeCh-Infusion injiziert, so bildete sich auch dann das Ausmaß der Durchblutungsänderungen teilweise zurück (Abb. 2).

Die Durchblutungsgrößen (bezogen auf die Ruhedurchblutung als 100%) betrugen unter Atropin in der 1. Phase: 80 (50—100)%, in der 2. Phase: 115 (95—155)% und in der 3. Phase: 95 (80—100)%.

Die durch MeCh ausgelösten Veränderungen sind demnach erheblich atropinresistenter als die Veränderungen der anderen gemessenen Größen Blutdruck, Salivation und Herzfrequenz. Der Atropineinfluß auf die Muskeldurchblutungsänderungen war ungleichmäßig, da die 2. Phase

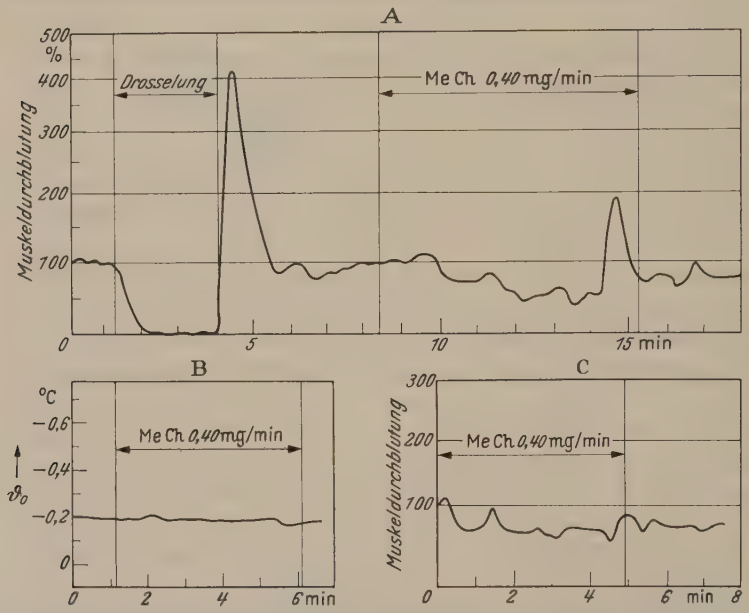


Abb. 3. Fortlaufende Registrierung der Durchblutung im rechten M. Gastrocnemius. Angaben in Prozent der Ruhedurchblutung. In Teil A sind während einer MeCh-Infusion die typischen mehrphasigen Durchblutungsreaktionen zu sehen (s. Text). Bei ungeheizter Sondenspitze und unveränderter Sondenlage bleibt die Temperaturdifferenz ϑ_0 zwischen den Lötstellen der Sonde während des Ablaufs einer gleichen MeCh-Infusion praktisch konstant

stärker als die 1. Phase reduziert wurde. Wie der Vergleich der prozentualen Muskeldurchblutungsveränderungen ergibt, betrugen im Mittel unter Atropin die Durchblutungsänderungen in der 1. Phase 50%, in der 3. Phase 30%, in der 2. Phase dagegen nur noch 15% der vor der Atropinisierung gemessenen Reaktionen.

Die Atropinwirkung verminderte zwar deutlich die MeCh-Wirkung auf die Muskeldurchblutung, hatte jedoch keinen erkennbaren Einfluß auf die Größe der reaktiven Hyperämie. Abb. 4 zeigt dies in einem Beispiel. Die Mehrdurchblutung in der 2. Phase war anfangs mit 270% fast so groß wie die reaktive Hyperämie von 300% der Ruhedurchblutung. Zwischen der oberen und der unteren Kurve der Abb. 4 sind

8 min vergangen, in denen 0,5 mg Atropinsulfat i.v. injiziert wurden. Bei einer folgenden MeCh-Infusion stieg in der 2. Phase die Durchblutung nur noch auf 140% der Ruhedurchblutung an, eine anschließende reaktive Hyperämie dagegen war sogar noch höher als zuvor, wahrscheinlich deshalb, weil die arterielle Drosselung etwa 30 sec länger als bei der ersten Drosselung bestanden hatte (s. dazu GOLENHOFEN u. HILDEBRANDT[13]).

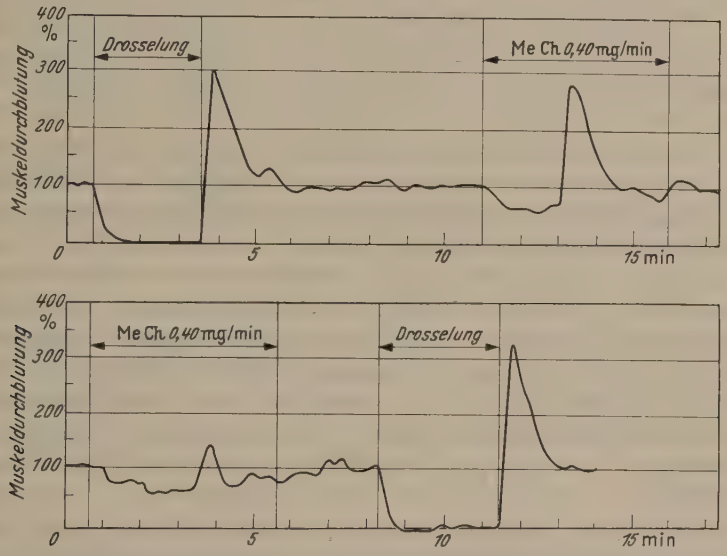


Abb. 4. Fortlaufende Registrierung der Durchblutung im rechten M. Gastrocnemius. Eichung in Prozent der Ruhedurchblutung. Zwischen der oberen und der unteren Kurve liegt eine Zeitdifferenz von 10 min, während der 0,5 mg i.v. Atropinsulfat injiziert wurde. Die Durchblutungsreaktion während der MeCh-Infusion sind unter Atropin erheblich schwächer als zuvor, während die reaktive Hyperämie unverändert geblieben ist. (Näheres s. Text)

Besprechung der Ergebnisse

Der Befund einer unter MeCh anfänglich verminderten Muskeldurchblutung (*1. Phase*) bei gleichzeitig gesteigerter Durchblutung der Haut ist nicht überraschend. Zeigt doch die synchrone Registrierung der Haut- und Muskeldurchblutung des Menschen, daß sich viele gefäßwirksame Substanzen in ihrer Wirkung auf die Haut- und Muskelgefäße auch qualitativ außerordentlich unterscheiden (HENSEL, RUEF u. GOLENHOFEN[20]). Nicht nur körperfremde, sondern auch körpereigene Stoffe wie das Adrenalin, welches in kleinen Dosen am ruhenden Muskel zu einer Mehrdurchblutung führt, während es die Hautgefäße verengert (BARCROFT u. SWAN[3], BARCROFT, HENSEL u. KITCHIN[4], BOCK, HENSEL u. RUEF[6]) zeigen diese unterschiedliche Wirkung.

Während beim Adrenalin diese Unterschiede durch aktive Veränderungen der Gefäßkaliber zustandekommen (BARCROFT u. SWAN[3], ALLEN, BARCROFT u. EDHOLM[1], DÖRNER[8], GOLENHOFEN, HENSEL u. RUEF[12], LUNDHOLM[26]), wird die durch

eine Reihe von Pharmaka ausgelöste Abnahme der Muskeldurchblutung als passive Änderung infolge der Mehrdurchblutung der Haut vermutet (Barcroft u. Swan[3], Hensel[21]). „Keinesfalls kann man aus einer Veränderung der menschlichen Hautdurchblutung auf eine entsprechende Wirkung am Muskel schließen" (Hensel[21]).

Eine verläßliche Registrierung der Hautdurchblutungsveränderungen unter MeCh ist jedoch bis heute nicht durchgeführt worden. Vielmehr stützen sich alle Annahmen entweder auf plethysmographische Messungen an Katzen und Kaninchen (Molitor[27]), auf thermometrische Untersuchungen (Starr[32], Goldsmith[11], Page[28]) oder nur auf die visuelle Beobachtung (Starr[32]). Die Plethysmographie ist zur Unterscheidung von Haut- und Muskeldurchblutungsänderungen gewöhnlich nicht geeignet (Barcroft, Bock, Hensel u. Kitchin[5]). Auch die Thermometrie vermittelt keine exakte Angabe von Durchblutungsänderungen (siehe dazu Hensel[23]). Sie vermag lediglich stärkere Durchblutungsreaktionen qualitativ richtig anzugeben.

Solche stärkeren Hautdurchblutungsreaktionen liegen jedoch ohne Zweifel bei den von uns beschriebenen MeCh-Infusionen vor, bei denen sich vor allem die Haut des Gesichtes, aber auch deutlich erkennbar die der Extremitäten und des Thorax innerhalb einiger Sekunden nach Wirkungsbeginn hellrot verfärbte. So sah beispielsweise Goldsmith[11] unter MeCh eine maximale Zunahme der Fingertemperatur von durchschnittlich 5,82° C. Wir haben daher keinen Anlaß, an dem Vorhandensein einer kräftigen Hautdurchblutungssteigerung zu zweifeln. Es wird jedoch für die weitere Wirkungsanalyse des MeCh von Wichtigkeit sein, neben der Muskeldurchblutung auch — wie vorgesehen — die Hautdurchblutung mit einer geeigneten Methode quantitativ und fortlaufend zu registrieren.

Im Gegensatz zur 1. Phase kann die *2. Phase* mit ihrem steilen und kurzfristigen Durchblutungsanstieg nicht einer unmittelbaren Wirkung des MeCh zugeschrieben werden. Diese erfolgt vielmehr spätestens 90 sec nach dem Infusionsbeginn, also innerhalb der bekannten Zirkulationszeiten, und ist an den gleichzeitig einsetzenden Veränderungen von Salivation, Blutdruck, Herzfrequenz und Hautdurchblutung gut erkennbar. Die 2. Phase ist auch nicht als eine spontan-rhythmische Änderung der Muskeldurchblutung zu deuten, da sie sich von diesen durch stärkere Anstiegssteilheit und größere Amplitude deutlich unterscheidet (Abschn. 1 b). Eine in ihren Ursachen der reaktiven Hyperämie ähnliche Art der Mehrdurchblutung ist ebenfalls ausgeschlossen, da 1. die dazu notwendige Voraussetzung einer längerdauernden, stärkeren Durchblutungsdrosselung nicht besteht, 2. die Mehrdurchblutung auch bei gleicher Sondenlage und Durchblutungsabnahme in der 1. Phase zu ganz verschiedenen Zeiten nach dem Beginn der MeCh-Wirkung mit gleicher Amplitude eintreten kann und 3. durch Atropin zwar die 2. Phase, nicht aber die reaktive Hyperämie verkleinert wird (Abschn. 3 und Abb. 4).

Auffällig ist dagegen die Ähnlichkeit der 2. Phase mit der Wirkung physiologischer Adrenalindosen auf die Skeletmuskeldurchblutung.

Diese führen nach i.v. Einzelinjektionen am ruhenden Muskel ebenfalls regelmäßig zu einer kurzdauernden Durchblutungssteigerung (Grant u. Pearson[17], Allen, Barcroft u. Edholm[1], Barcroft u. Swan[3], Bock, Hensel u. Ruef[6], Golenhofen, Hensel u. Ruef[12], Lundholm[26]), die im Mittel mindestens 300% der Ruhedurchblutung erreicht (Golenhofen, Hensel u. Ruef[12]). Auch Adrenalininfusionen bewirken häufig zu Anfang eine stärkere Mehrdurchblutung des Muskels, die oft schon nach einigen Sekunden auf den Ausgangswert zurückgeht, um dann wieder etwas über den Ausgangswert hinaus anzusteigen. Barcroft u. Swan[3] haben dieses als „sustained dilatation" beschrieben, welches recht gut die 3. Phase der MeCh-Wirkung erklären könnte, in der die Muskeldurchblutung im Mittel um 15% der Ausgangsdurchblutung weniger vermindert war als in der 1. Phase (s. Abschn. 1b und Abb. 1, 2 u. 4). Die mit der Wirkung physiologischer Adrenalindosen verbundene Steigerung der Herzfrequenz wird infolge der hohen Ausgangslage der Frequenz unter MeCh kaum zu beobachten sein (s. Abb. 1A).

Von Bedeutung wäre die Feststellung, ob sich, wie das von der Adrenalinwirkung bekannt ist (Näheres s. Bock, Hensel u. Ruef[6]), Muskel- und Hautdurchblutung in der 2. und 3. Phase entgegengesetzt verhalten. Ein Hinweis auf mögliche Hautdurchblutungsveränderungen liegt vor, da wir mit dem bloßen Auge beobachten konnten, wie die anfänglich extreme Rötung der Gesichtshaut im weiteren Verlauf der MeCh-Infusion — bei Fortbestehen der Veränderungen von Salivation, Blutdruck und Herzfrequenz — häufig merklich abblaßte.

Die Annahme einer Adrenalinwirkung wird dadurch unterstützt, daß MeCh-Infusionen bei Phäochromocytomkranken einen massiven Blutdruckanstieg zur Folge haben, was sogar zur Grundlage eines Testes für die Phäochromocytomdiagnose geworden ist (Guarneri u. Evans[18]). Diese Blutdruckkrisen sind mit einer erhöhten Ausscheidung von Katecholaminen im Urin verbunden (s. dazu v. Euler[10]). Ob durch MeCh jedoch auch bei Gesunden eine, hier natürlich geringere, Quantität von Katecholaminen freigesetzt wird, ist bisher nicht eindeutig bekannt. So fand Elmadjian[9] bei 3 Versuchspersonen nach 10 mg MeCh i.m. zwar eine beträchtliche Zunahme der Noradrenalin-, nicht aber der Adrenalinkonzentration im Urin. Vielfach sind jedoch die durch physiologische Adrenalin- und Noradrenalindosen bedingten Reaktionen objektiv und subjektiv kaum wahrnehmbar und können deshalb leicht der Beobachtung entgehen. Die Skeletmuskeldurchblutung reagiert aber bereits auf physiologische Adrenalindosen sehr deutlich, weshalb die fortlaufende Registrierung der Muskeldurchblutung besonders geeignet ist, die Ausschüttung solcher geringen Adrenalinquantitäten zu entdecken. Unter Berücksichtigung der Muskeldurchblutungsveränderungen in der 2. und 3. Phase der MeCh-Wirkung besteht deshalb Grund zu der

Annahme, daß die Freisetzung physiologischer Quantitäten von Katecholaminen auch beim Gesunden erfolgen kann.

Die Ursachen hierfür können vielfältig sein: Der Blutdruckabfall kann über die Baroreceptoren den Sympathicus stimulieren. Eine solche Stimulierung kann auch durch die während der MeCh-Infusion auftretenden Gefühle körperlichen Unbehagens erfolgen; daß psychische Stimulationen allein eine typische adrenalinbedingte Mehrdurchblutung des Skeletmuskels bewirken können, wurde erst kürzlich von Golenhofen u. Hildebrandt[15] gezeigt. Auch eine direkte Einwirkung des MeCh auf das Nebennierenmark ist möglich. Ontogenetisch ist das Nebennierenmark als ein sympathisches Ganglion zu betrachten. In einer kritischen Übersicht über die Begriffe muscarinähnlicher und nicotinähnlicher Effekte hat Ambache[2] vor kurzem darauf hingewiesen, daß MeCh zu einer Gruppe cholinergischer Pharmaka gehört, welche alle einen stimulierenden Effekt auf die Synapsen in den sympathischen Ganglien haben, aber nicht auf die neuromuskulären Verbindungen einwirken. Atropin kann in ausreichenden Dosen dem Effekt auf die Ganglien entgegenwirken, und es sollte folglich auch denkbar sein, daß es in genügend hoher Konzentration die Durchblutungsänderungen während der MeCh-Wirkung beseitigt.

Summary

1. In seven subjects, with normal cardiovascular systems, the effects on the muscle blood flow of intravenous infusions of acetyl-β-methylcholine iodide (MeCh) at an infusion-rate of 0,40 mg./min. were determined by use of Hensels „Wärmeleitsonde". Simultaneous measurements of salivation, arterial blood pressure and heart rate were also made.

2. The changes in muscle blood flow occurring with MeCh can be divided in 3 successive phases:

In the *first phase* there is a decrease in blood flow to approximately 60 per cent of the resting value. This occurs together with the other symptoms of MeCh action.

In the *second phase* there is a sudden rapid increase in muscle blood flow to 200 per cent of the resting value.

In the *third phase* there is again a decrease in blood flow amounting to approximately 85 per cent of the resting blood flow.

The increase in blood flow („second phase"), under certain circumstances, occured repeatedly.

3. 0,5—1,0 mg. atropine sulfate minimized the changes in blood flow but never abolished them completely in contrast to its complete elimination of the other effects of MeCh.

4. The increase in blood flow occurring during the second phase resembles intravenous injections of adrenaline. Reasons are given for the assumption that the second and third phase occur as a result of the secretion of adrenaline.

Literatur

[1] Allen, W. J., H. Barcroft and O. G. Edholm: On the action of adrenaline on the blood vessels in human skeletal muscle. J. of Physiol. **105**, 255 (1946). — [2] Ambache, N., W. L. M. Perry and P. A. Robertson: The Effect of Muscarine on Perfused Superior Cervical Ganglia of Cats. Brit. J. Pharmacol. **11**, 442 (1956). — [3] Barcroft, H., and H. J. C. Swan: Sympathetic control of human blood vessels. London 1953. — [4] Barcroft, H., H. Hensel and A. H. Kitchin: Comparison of plethysmograph and thermo-electric needle records of calf blood flow during intravenous adrenaline infusions. J. of Physiol. **127**, 7 P (1955). — [5] Barcroft, H., K. D. Bock, H. Hensel u. A. H. Kitchin: Die Muskeldurchblutung des Menschen bei indirekter Erwärmung und Abkühlung. Pflügers Arch. **261**, 199 (1955). — [6] Bock, K. D., H. Hensel u. J. Ruef: Die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Muskel- und Hautdurchblutung des Menschen. Pflügers Arch. **261**, 322 (1955). — [7] Diamant, B., H. Diamant and B. Holmstedt: The Salivary Secretion in Man under the Influence of Intravenously Infused Acetyl-β-methylcholine Iodide. Arch. internat. Pharmacodynamie 1957 (im Druck). — [8] Dörner, J.: Vergleichende Untersuchungen über die Kreislaufwirkungen des Adrenalins und Arterenols im Tierexperiment. Arch. Kreislaufforsch. **21**, 88 (1954). — [9] Elmadjian, F.: Neuropharmacology. Transactions of the Second Conference, J. Macy Foundation 1955, S. 172. — [10] Euler, U. S. v.: Noradrenaline, S. 304f. Springfield, Ill., USA: Charles C. Thomas 1956. — [11] Goldsmith, G. A.: Effectiveness of acetyl-β-methylcholine given by mouth as a vasodilating agent. Ann. Int. Med. **9**, 1196 (1935/36). — [12] Golenhofen, K., H. Hensel u. J. Ruef: Über die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Muskeldurchblutung des Menschen und ihre Beeinflussung durch Regitin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 269 (1955). — [13] Golenhofen, K., u. G. Hildebrandt: Die Muskeldurchblutung des Menschen nach arterieller Drosselung. 20. Internat. Physiol. Kongreß, Brüssel 1956. — [14] Golenhofen, K., H. Hensel u. G. Hildebrandt: Richtlinien zur Messung der Muskeldurchblutung des Menschen mit der Wärmeleitsonde nach Hensel. Druckschrift der Hartman & Braun A.G. in Frankfurt a. M. 1956. — [15] Golenhofen, K., u. G. Hildebrandt: Psychische Einflüsse auf die Muskeldurchblutung. Pflügers Arch. **263**, 637 (1957). — [16] Golenhofen, K., u. G. Hildebrandt: Über spontan-rhythmische Schwankungen der Muskeldurchblutung des Menschen. Z. Kreislaufforsch. 1957 (im Druck). — [17] Grant, R. T., and R. S. B. Pearson: The blood circulation in the human limb. Observations on the difference between the proximal and distal parts and remarks on the regulation of body temperature. Clin. Sci. **3**, 119 (1938). — [18] Guarneri, V., and J. A. Evans: Pheochromocytoma. Report of a case, with a new diagnostic test. Amer. J. Med. **4**, 806 (1948). — [19] Hensel, H., J. Ruef u. K. Golenhofen: Fortlaufende Registrierung der Muskeldurchblutung am Menschen mit einer Calorimetersonde. Pflügers Arch. **259**, 267 (1954). — [20] Hensel, H., J. Ruef u. K. Golenhofen: Die Muskel- und Hautdurchblutung des Menschen bei Einwirkung vasoaktiver Substanzen. Z. Kreislaufforsch. **43**, 756 (1954). — [21] Hensel, H.: Über die Steuerung der peripheren Durchblutung. Arch. physik. Therap. **7**, 60 (1955). — [22] Hensel, H., u. K. D. Bock: Durchblutung und Wärmeleitfähigkeit des menschlichen Muskels. Pflügers Arch. **260**, 361 (1955). — [23] Hensel, H.: Kritische Betrachtungen zur Messung der Hautdurchblutung mit thermischen Methoden. Klin. Wschr. **1956**, 1273. — [24] Krasnogorski, N. I.: Psychology and Psychopathology in childhood as a branch of pediatric investigation. Acta Paediatr. **11**, 481 (1930). — [25] Lindgren, P., and B. Uvnäs: Photoelectric recording of the venous and arterial blood flow. Acta physiol. scand (Stockh.) **32**, 259 (1954). — [26] Lundholm, L.: The Mechanism of the vasodilator Effect of Adrenaline. I. Effect on skeletal muscle

vessels. Acta physiol. scand. (Stockh.) Suppl. **133** (1956). — [27] Molitor, H.: Comparative Study of the Effects of Five Choline Compounds Used in Therapeutics. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **58**, 337 (1936). — [28] Page, J. H.: Acetyl-β-methylcholin (Mecholin). Observations concerning its action on blood pressure, skin temperature and heart, as exhibited by electrocardiogram of hypertensive patients. Amer. J. Med. Sci. **189**, 55 (1935). — [29] Rein, H.: Vasomotorische Regulationen. Erg. Physiol. **32**, 28 (1931). — [30] Schoop, W., u. H. Marx: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **22**, (1956). — [31] Simonart, A.: On the Action of Certain Derivatives of Choline. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **46**, 157 (1932). — [32] Starr, J.: Acetyl-β-methylcholin. Its Action on Paroxysmal Tachycardia and Peripheral Vascular Disease, with Discussion of its Action in Other Conditions. Amer. J. Med. Sci. **186**, 330 (1933).

Docent B. Holmstedt u. Dr. K. Graf, Pharmakologische Abteilung und
Docent H. Diamant, Hals-Nasen-Ohrenklinik des Karolinska Institutes,
Stockholm

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 91—95 (1957)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A. G. Berlin-West

Der Abbau von α-Phenylpropylalkohol im Organismus von Kaninchen, Hund und Mensch

Von

J. Gruneberg und H. Langecker*

(Eingegangen am 8. April 1957)

Der α-Phenylpropylalkohol (I) hat wegen seiner choleretischen Wirkung in der Klinik Interesse gefunden (Brügel, Döpke, Koch, Rössing). Es schienen daher Untersuchungen über sein Verhalten im Stoffwechsel wünschenswert, die an Hand der in Harn und Galle bei Kaninchen, Hund und Mensch auftretenden Abbauprodukte durchgeführt wurden. Die chemische Konstitution von I ließ neben der Ausscheidung des unveränderten und eventuell gepaarten Alkohols Propiophenon bzw. Benzoesäure oder Hippursäure nach Oxydation in der Seitenkette und nach Oxydation im Ring p-Oxy-phenylpropylalkohol und p-Oxy-benzoesäure erwarten.

Es wurden zunächst für den Nachweis der einzelnen Metabolite geeignete Reaktionen aufgesucht und auf die Aufarbeitung von Harn und Galle übertragen.

Methodik

I wurde im Wasserdampfdestillat von Harn und Galle nach Oxydation mit Bichromatschwefelsäure als Propiophenon bestimmt (s. u.). Propiophenon wurde direkt im Wasserdampfdestillat von Harn und Galle als 2,4-Dinitrophenylhydrazon bestimmt, das in Tetrahydrofuran-Lösung mit methylalkoholischer Kalilauge eine intensive Rotfärbung gibt.

Reagentien:

1. Konz. Schwefelsäure p. A.

2. 2%ige Dinitrophenylhydrazinlösung (frisch bereitet), 2 g in 50 cm³ 85%iger Phosphorsäure gelöst, werden mit 50 cm³ Alkohol versetzt.

3. Tetrahydrofuran (reinst).

4. 2 n methylalkoholische Kalilauge.

Arbeitsgang. 10 cm³ der zu bestimmenden Lösung wurden in einem gut verschließbaren Zentrifugenglas mit 0,5 cm³ 1 und 1 cm³ 2 versetzt und über Nacht auf 37°

---

* Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden von dem einen von uns als Dissertation an der naturw. Fakultät der Freien Universität Berlin 1956 vorgelegt.

erwärmt. Am nächsten Tage wurde 20 min bei 2500 U/min zentrifugiert, die überstehende klare Flüssigkeit abpipettiert, der Niederschlag mit 10 cm³ Wasser versetzt und erneut 20 min zentrifugiert. Das Waschwasser wurde möglichst vollständig entfernt und der Hydrazonniederschlag in 5 cm³ 3 gelöst. Nach Zugabe von 25 cm³ 4 wurde die entstandene Rotfärbung sofort colorimetriert.

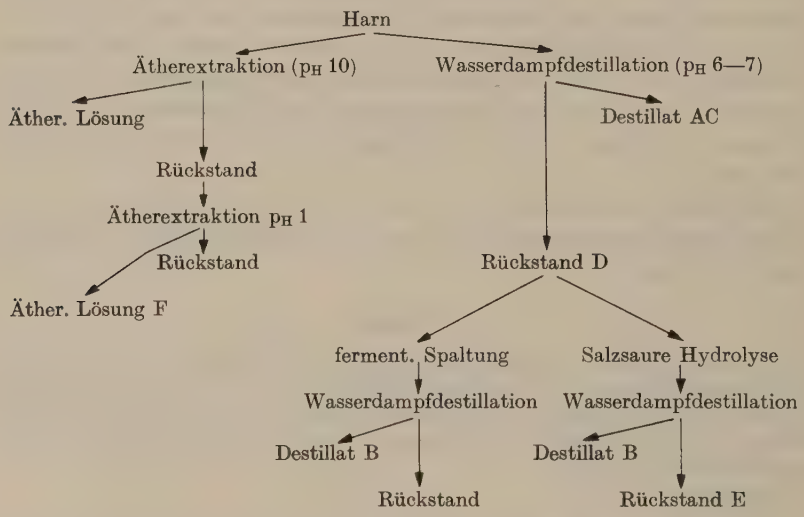
Die Hippursäure wurde im Rückstand der Wasserdampfdestillation nach Dickens u. Pearson bestimmt.

Der p-Oxyphenylpropylalkohol wurde im Rückstand der Wasserdampfdestillation nach Hydrolyse als Phenol mit dem Folin-Ciocalteau-Reagens bestimmt.

p-Oxybenzoesäure wurde nach einer Vorextraktion des Harns mit Äther bei p_H 10 im Rückstand durch Ätherextraktion bei p_H 1 abgetrennt und durch Kuppelung mit diazotiertem Nitranilin als Azoverbindung bestimmt (Bray).

Für die Bestimmung des gepaarten Alkohols wurde der Harn mit Salzsäure oder β-Glucuronidase hydrolysiert.

Da normalerweise im Harn Hippursäure, Phenole und Oxybenzoesäure auftreten, wurden in den Tierversuchen in entsprechenden Vorversuchen die Normalwerte ermittelt und von den während der I-Gabe auftretenden in Abzug gebracht. Folgendes Schema soll die Aufarbeitung von Harn und Galle veranschaulichen:



A = α-Phenylpropylalkohol frei
B = α-Phenylpropylalkohol gebunden
C = Propiophenon
D = Hippursäure
E = p-Oxyphenylpropylalkohol gebunden
F = p-Oxybenzoesäure

Kaninchen im Gewicht von 1,9—3,0 kg erhielten 100, 250, 500 und 1000 mg/kg I i.d. oder p.o. als Gummisuspension. Für die Untersuchung der Ausscheidung in der Galle wurden Tiere mit Choledochusfistel benutzt. Hunde im Gewicht von 7—23 kg erhielten 50—200 mg/kg p.o. als Gummisuspension bzw. 25 mg/kg i.v. der 10%igen

Lösung vom Natriumsalz des sauren Bernsteinsäureesters. Die Ausscheidung in der Galle wurde an einem Hund mit Choledochusfistel untersucht. In einem Selbstversuch wurden 8 mg/kg in Gelatine-Perlen à 100 mg p.o. eingenommen.

In Tab. 1 sind die Versuchsergebnisse unter Angabe des Streubereiches zusammengestellt.

Tabelle 1. *Stoffwechselprodukte im Harn nach Eingabe von α-Phenylpropylalkohol*

Versuchsobjekt	α-Phen.prop.Alk.		Propiophenon	Hippursäure	p-Oxyphen. prop. Alk.	p-Oxybenzsr.	Gesamtausscheidung
	frei	geb.					
Kaninchen (7 Vers.) . . .	3,08 ± 0,58	25,16 ± 2,85	0,88 ± 0,17	17,97 ± 2,58	3,77 ± 2,29	0	48,59 ± 2,14
Hund (4 Vers.)	3,18 ± 0,43	18,99 ± 1,78	0,89 ± 0,22	14,55 ± 1,03	20,47 ± 1,77	0	60,58 ± 0,45
Mensch	6,23	10,19	2,37				18,79

[1] Die Zahlen bedeuten % der Eingabe ($m \pm \varepsilon$).

Daraus ergibt sich, daß bei Kaninchen und Hund nur geringfügige Mengen unveränderten I im Harn auftreten (3%), beim Menschen etwa 6%. Beim Kaninchen erscheint ein Viertel der Eingabe als gepaarter Alkohol, beim Hund ein Fünftel und beim Menschen ein Zehntel. Die Ausscheidung als Keton ist bei den 3 Species sehr gering. Die Hippursäureausscheidung beträgt beim Kaninchen 18%, beim Hund 14,5% der Eingabe. Die Hippursäureausscheidung ist nach niedrigeren Gaben größer als nach höheren, was dafür spricht, daß eine gewisse Kapazität der Leber-Konjugation nicht überschritten werden kann. p-Oxyphenylpropylalkohol tritt beim Hund in beachtlichen Mengen auf (20%), beim Kaninchen sind es nur 4%. p-Oxybenzoesäure konnte nicht nachgewiesen werden. In der Galle wurden bei Hund und Kaninchen I und sein Konjugat nur in ganz geringen Mengen nachgewiesen.

Die Ausscheidung der Metabolite im Harn erreicht bei Hund und Kaninchen schon nach 3 Std das Maximum. In 2 Versuchen beim Hund konnte der Nachweis erbracht werden, daß die mit salzsaurer Hydrolyse ermittelten Werte für gepaarten I mit den nach Glucuronidaseinkubation gefundenen übereinstimmten, so daß das Konjugat offenbar ein Glucuronid ist. Dies steht in Einklang mit Angaben der Literatur, daß Propiophenon als Äthylphenylcarbinolglucuronsäure ausgeschieden wird (Nencki, Smith, Smithies and Williams und Thierfelder u. Daiber). Es tritt demnach neben der Paarung des Alkohols Oxydation in der Seitenkette bis zur Benzoesäure bzw. Oxydation im Ring auf, während

gleichzeitige Oxydation in Ring und Seitenkette nicht beobachtet wurde. Während demnach im Tierversuch ein erheblicher Anteil der Eingabe in seinen Stoffwechselendprodukten zu übersehen ist, war es beim Menschen nicht möglich, solche Aufschlüsse zu bekommen, da die Belastbarkeit des Menschen zu gering ist, um mit den verwendeten Methoden zu einwandfreien Aussagen zu gelangen.

Wir hatten erwartet, daß I als Alkohol ähnlich wie Cholesterin in der Galle ausgeschieden wird. Die überraschende Tatsache, daß in der Galle von Kaninchen und Hund weder freier noch gebundener Alkohol nachgewiesen werden konnte, gibt Anlaß, über den Mechanismus der I-Wirkung zu diskutieren: Eine Beteiligung einer Secretinsekretion an einem solchen Mechanismus ist nach peroraler Gabe gar nicht so unwahrscheinlich, unwahrscheinlich jedoch nach i.v. Darreichung, wenn man nicht annehmen will, daß eine Ausscheidung in den Darm erfolgt. Allerdings spricht die Tatsache, daß Secretin nur ein Hydrocholereticum ist, während mit der Wirkung des I auch eine vermehrte Ausscheidung der Festsubstanzen verbunden ist, gegen eine solche Annahme. Daß der lipoidlösliche I in die Leberzelle eindringt, ist sehr wahrscheinlich. Auch für das Secretin wird als Angriffspunkt die Zelle angenommen. Das bedeutet immer noch nicht, daß I auch in der Galle ausgeschieden werden müßte. Man hat allerdings für andere Choleretica, wie Dehydrocholsäure, eine Ausscheidung in der Galle nachweisen können. So fand Shimizu beim Hund bis zu 30% der Eingabe in der Galle wieder, während im Harn nur kleine Mengen auftraten. Auch das gallegängige Adipinsäure-di-(3-carboxy-2,4,6-trijodanilid) hat eine choleretische Wirkung. Der Wirkungsmechanismus von I und Dehydrocholsäure scheint demnach verschieden zu sein. Sekretionssteigerung durch einen Stoff muß nicht dessen bevorzugte Ausscheidung bedeuten.

Summary

The catabolism of α-phenylpropylalcohol in rabbits, dogs, and man has been studied on the basis of determination of its metabolites in the urine and bile and it has been established that in rabbits and dogs I occurs in the urine in insignificant quantities only, whereas in man up to 6%. In rabbits $^1/_4$ of the intake appears in the form of glucuronide in the urine, in dogs $^1/_5$ and in man $^1/_{10}$. The excretion of the ketone in the 3 species is minimal. The excretion of hippuric acid is 18% in rabbits, 14,5% in dogs. p-oxybenzoic acid could not be identified. In the bile of rabbits and dogs we found neither I nor its glucuronide in any quantities worth mentioning. The fact that α-phenylpropylalcohol is not excreted in the bile allows conclusions as to its mechanism of action and shows that an increased secretion must not necessarily coincide with an increased excretion of the substance.

Literatur

Bray, H. G., B. G. Humphris, W. V. Thorpe, K. White and P. B. Wood: Biochemic. J. **52**, 416 (1952). — Brügel, H., O. Döcker u. O. P. Mertz: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 1679. — Dickens, F., and J. Pearson: Biochemic. J. **48**, 216 (1951). — Döpke, G.: Münch. med. Wschr. **1956**, 1743. — Koch, E.: Medizinische **1955**, 1059. — Langecker, H., A. Harwart u. K. Junkmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 303 (1955). — Nencki, M. v.: J. prakt. Chem. **18**, 288 (1878). — Rössing, P.: Ärztl. Wschr. **1955**, 382. — Shimizu, K., u. T. Shimizu: Z. physiol. Chem. **295**, 67 (1953). — Smith, J. N., R. H. Smithies and R. T. Williams: Biochemic. J. **56**, 317 (1954). — Thierfelder, H., u. K. Daiber: Z. physiol. Chem. **130**, 380 (1925).

Professor Dr. Hedwig Langecker, Berlin N 65, Müllerstraße 170/172

Arch. exper. Path. u. Pharmokol., Bd. 231, S. 96—110 (1957)

Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie und experimentelle Pathologie der Freien Universität Berlin (Direktor: Professor Dr. med. H. F. Zipf)

Darstellung der totalen und reversiblen Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren durch Wirkung / Zeit-Kurven *

Von
H. F. Zipf und P. Reichertz

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Februar 1957)

In früheren elektrophysiologischen Untersuchungen an afferenten Lungenvagus-Nerven konnten wir durch einmalige i.v. Dosen von *Dodecylpolyäthylenoxyd-äther (DoR 9/3)* eine weitgehende Ausschaltung der Lungendehnungsreceptoren herbeiführen (Zipf u. Kreppel, 1955). Zur Erreichung einer totalen Endoanaesthesie schienen damals noch Dosen nötig zu sein, die schon zu stärkeren Änderungen des EKG führten. Als wir in den späteren Untersuchungen jedoch den Weg der *i.v. Dauerinfusion* wählten, gelang es uns, mit erheblich geringeren Dosen nicht nur eine partielle, sondern auch *eine totale und reversible Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren ohne wesentliche EKG-Änderungen* einzustellen. Die besondere Natur des Stoffes als Netzmittel, seine Haftfestigkeit, seine relativ geringe Giftigkeit, aber auch die bevorzugte Lage der Lungen im Gesamtkreislauf kamen unseren Bemühungen entgegen. Über die Ergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

Zum ersten Male fanden wir dabei eine experimentelle Möglichkeit, in jedem Versuchspunkt den Grad der Endoanaesthesie durch eine reproduzierbare Bezugsgröße zu messen und den gesamten Endoanaesthesieablauf als *Wirkung/Zeit-Kurve* darzustellen. Als geeignetes und billiges Versuchstier bewährte sich auch hierbei wieder das *Meerschweinchen* in Urethannarkose.

Versuchsanordnung

Ableitung und Registrierung der *afferenten Aktionsstromtätigkeit im kopfwärts durchschnittenen Halsvagus-Nerven* mit einem RC-Verstärker von Schäfer (1950), modifiziert von Raule (1951), und des EKG mit einem Differentialverstärker nach Kulp. Einzelheiten siehe bei Zipf u. Miestereck (1953), sowie Kreppel u. Zipf (1955).

Herrn Professor Dr. Junkmann zum 60. Geburtstag gewidmet.

Zur Gewährleistung einer gleichbleibenden Lungendehnung wurden die *urethanisierten Meerschweinchen* durch einen mit Preßluft betriebenen kleinen Beatmungsapparat (Modell des Pharmakologischen Instituts der Universität Mainz) *künstlich beatmet*. Die Beatmungskurve projizierten wir vom Seitenweg des zur Trachea führenden Schlauches über eine Spiegel-Membrankapsel auf den Blauschirm eines Kathodenstrahloszillographen und registrierten sie auf dem photographischen Filmpapier.

Die nachstehenden *methodischen Erweiterungen* erwiesen sich als sehr wertvoll für die akustische Verfolgung, die akustische Fixierung und die „graphische" Auswertung des Versuchsverlaufes:

1. Durchlaufende, akustische Kontrolle (Mithören) *der Aktionsstromtätigkeit* im Halsvagus mittels einer *Lautsprecherstufe*, bestehend aus einem einfachen zusätzlichen Verstärker und einem Lautsprecher: Zusammen mit der Leuchtschirmbeobachtung ermöglichte sie, den jeweiligen Grad der Endoanaesthesie, besonders der totalen, noch genauer festzustellen als früher.

2. Fixierung der Impulstätigkeit auf Tonband mittels eines Tonbandgerätes *TK8/3D* der Firma Grundig, *zwecks nachträglicher akustischer Wiedergabe des Versuchsablaufes oder optischer Rückdarstellung auf dem Leuchtschirm des Kathodenstrahloszillographen*: Auf diese Weise konnten wir den gesamten Versuch wiederholt reproduzieren und besser analysieren. Es ließen sich auch sonstige Beobachtungen und verschiedene Versuchsmaßnahmen leicht protokollieren.

3. Überführung der Impulstätigkeit in einen „integrierenden" Ampèremeterausschlag und ihre graphische Auswertung in Form von Wirkung/Zeit-Kurven: Die fortlaufenden Änderungen der Höhe und Dichte der Aktionsimpulse während der künstlich geregelten Inspiration, Exspiration und Exspirationspause lassen sich zwar auf dem Leuchtschirm gut verfolgen und durch die auf Filmpapier gemachten Stichaufnahmen in den günstigsten Versuchspunkten festhalten. Es ist auch, wie dies in den früheren Arbeiten erfolgte, eine Abschätzung des Grades und der Dauer der partiellen bzw. totalen Endoanaesthesie möglich. Sehr von Vorteil erwies sich jedoch der Anschluß eines *Ampèremeters* an den Ausgang des RC-Verstärkers unter Zwischenschaltung, entweder des oben genannten Verstärkers der Lautsprecherstufe oder des Verstärkers im Tonbandgerät. Hierfür konnte das von der Firma Hartmann u. Braun hergestellte Gerät „Multavi 5" als Wechselstromampèremeter vom Gleichrichtertyp von uns benutzt werden. Über den Innenwiderstand von 4,6 Ω wurde die inspiratorisch zunehmende und exspiratorisch wieder abnehmende Aktivität (Amplituden- und Frequenzänderungen) der Lungendehnungsreceptoren in einen Zeigerausschlag umgewandelt. Es wurde eine „Integration" durch Messung des jeweiligen Stromflusses vorgenommen. Gleichlaufend mit dem optischen und akustischen Eindruck von Leuchtschirm und Lautsprecher stellte sich der Zeiger (langsam ansteigend) auf einen inspiratorischen Höchstwert und (schneller abfallend) auf einen Minimalwert (entsprechend der Atempause, „Zwischenstrecke") ein. Der Minimalwert enthält die Restaktivität der nicht völlig entblähten Lunge und die sonstigen Halsvagusafferenzen (siehe unten). Es ist zweckmäßig, nachträglich das Tonband abspielen zu lassen und dann die Ablesung der Galvanometerausschläge vorzunehmen. In allen Versuchsabläufen selbst und bei der Auswertung der Tonbänder haben wir den normalen Ausgangswert der Impulsspindeln am „magischen Auge" des Tonbandgerätes auf den Maximalwert ausgesteuert. Die in den Abb. 3 und 4 dargestellten Wirkung/Zeit-Kurven wurden durch die graphische Auswertung solcher Tonbandaufnahmen gewonnen (siehe unten). In den späteren Untersuchungen benutzten wir auch den direkt schreibenden, tragbaren *Universal-Strom- und Spannungsschreiber* der AEG, mit dem während des gesamten Versuches der Endoanaesthesieverlauf direkt registriert wurde. Auch dieses Gerät ist vom

Gleichrichtertyp. Es wurde in gleicher Weise angeschlossen wie das „Multavi 5" von Hartmann u. Braun. Ein Versuchsbeispiel ist durch die Abb. 5 wiedergegeben. Dieses Instrument ist infolge seines großen Trägheitsmomentes an sich für langsamere Einstellgeschwindigkeiten bestimmt. Im Bereich der kleineren und mittleren Ausschläge deckt sich die Einstellgenauigkeit weitgehend mit der des „Multavi 5". Bei den Maximalausschlägen in der Ausgangslage, sowie in der Restitution schwingt der Zeiger um einen geringen Betrag über den wirklichen Hoch- bzw. Tiefpunkt hinaus. Dem gegenüber steht der sehr große Vorteil der direkten und kontinuierlichen Registrierung und Verfolgung des Versuchsverlaufes.

Zweifellos handelt es sich hier nicht um eine echte Integration, die die Impulsfrequenz, -dichte und -breite aller Aktionsströme erfaßt. Eine solche Messung wäre mit größerem Aufwand durchaus möglich. Doch genügt unser Verfahren all den Forderungen, die man für die Festlegung von Wirkungseintritt, -ablauf, -maximum, Restitutionsbeginn und -ende stellen muß. Dies gilt auch dann, wenn man berücksichtigt, daß während der Inspiration, der Exspiration und der Beatmungspause neben den Lungendehnungsreceptoren noch viele andere Receptoren (bzw. sonstige afferente Strukturen) tätig sind. Sie liegen im Gebiet außerhalb der Lunge, des Bronchialsystems und der visceralen Pleura. Es handelt sich unter anderem auch um die Impulse aus dem Herzen und aus dem Aortenbogen. Gerade die afferenten Depressorimpulse treten bei der partiellen und totalen Endoanaesthesie in den „Zwischenstrecken" deutlich heraus.

Man kann natürlich faserarme Lungenvaguspräparate herstellen, wenn auch mit größerer Mühe und Zeitverlust. Wir verzichteten bewußt darauf, da man bei der Ableitung vom ganzen, unversehrten und gut ernährten Halsvagusnerven zeitlich gesehen bessere Ergebnisse bekommt, besonders im Hinblick auf die erwartete Reversibilität des endoanaesthetischen Effektes. Die Erfassung eines größeren Anteiles Lungenreceptoren-Aktivität erlaubt eine genauere Bestimmung der totalen Endoanaesthesie als die Heranziehung von faserarmen Präparaten, die nur einem Teil der Lungenreceptoren entspringen. Die Aufstellung einer Wirkung/Zeit-Kurve ist in dem letzteren Falle nur bei guter bildlicher Trennung durch Zählung der Impulse möglich. In den meisten Fällen halten aber solche faserarmen Präparate nicht lange genug aus, so daß die sich hinziehende Vertiefung der Endoanaesthesie und die Restitution gar nicht verfolgt werden können, besonders dann, wenn man die Dauerinfusion wählt. Unsere Ganznervenpräparate arbeiteten zuverlässig über viele Stunden hinweg. Es ist selbstverständlich, daß die Entstehung von Reibungspotentialen an den Elektroden infolge Bewegung des Halsvagus vermieden wird. Gerade die Endoanaesthesie, die Dauerentladung nach Veratrin, die Wirkung/Zeit-Kurve, überhaupt die Abhängigkeit der Wirkung von der Menge und Geschwindigkeit der Stoffzufuhr sind hierbei als wichtige Kriterien der richtigen Messung heranzuziehen.

Bei der *Auswertung der „integrierenden" Ampèremeterausschläge und ihrer prozentualen Erfassung in Form von Wirkung/Zeit-Kurven* wurden folgende Größen festgelegt:

A_{Jx} = Aktivität im Halsvagus während der Beatmung („Inspiration") zum beliebigen Zeitpunkt x

A_{Jo} = Ausgangslage

A_{Ex} = Aktivität im Halsvagus während der Beatmungspause („exspiratorische Pause")

ΔAx = Aktivitätszunahme während der Beatmung („Inspiration")
$= A_{Jx} - A_{Ex}$

R_x = relative Aktivitätszunahme während der Beatmung („Inspiration")
$= \frac{\Delta Ax}{\Delta Ao} \cdot 100\%$

In der Abb. 3 sind die Ausgangsgrößen A_{Jo}, A_{Eo} und ΔAo eingezeichnet. Als Maß für den *Endoanaesthesiegrad* wählten wir die Größe

$$E = 100\% - Rx.$$

Indem ΔAx mit tiefer werdender Endoanaesthesie immer kleiner wird, verringert sich der numerische Wert von R. Bei der totalen Endoanaesthesie müßte er den Wert Null erreichen, weil A_{Jx} mit A_{Ex} zusammenfällt. Dies ist in der Abb. 3, Kurve *1b* der Fall. In unseren Versuchen, bei denen die Ausschaltung der Lungendehnungsreceptoren erstrebt wurde, blieb teilweise ein Rest von ΔAx bestehen, der

Tabelle 1

Gesamtmenge DoR9/3 mg/kg i.v.	Davon in mg/kg als		Minimale partielle Endoanaesthesie (10% A_{Jo})		Maximaler Endoanaesthesiegrad E_{max} in %	Endoanaesthesie, beurteilt nach dem Bildmaterial	Endoanaesthesie-Dauer (E_{max} bis 50% A_{Jo})	Tiergewicht und Geschlecht	Kurve Nr.
	Dauerinfusion	Einzeldosen	mg/kg	nach min					
9,0	3,0	2 × 3,0	0,5	3,5	100	total	92	650♀	1b
10,6	5,4	4 × 1,3	0,85	6,5	94	fast total	105	750♂	7
10,8	5,8	2 × 2,0 1 × 1,0	0,54	3,0	95	total	102	570♂	2
11,4	7,0	4 × 1,0	0,3	1,5	94	fast total	103[1]	500♂	10
13,0	7,0	6 × 1,0	0,56	4,0	92	partiell	86[1]	680♀	8
13,0	8,0	5 × 1,0	0,77	4,5	88	partiell	65[1]	600♂	9
13,0	11,5	1 × 1,5	1,04	5,5	95	total	89	650♀	1a
14,6	6,2	6 × 1,4	0,84	6,0	97	total	97	720♂	3
16,0	16,0	—	0,38	2,0	95	total	84	500♂	6
18,0	11,0	7 × 1,0	0,81	4,5	86	partiell	89	540♀	5
20,0	9,0	5 × 2,2	1,3[1]	6,5[1]	89	partiell	50	460♀	4

[1] Durch Extrapolation aus der Mittelwertkurve gewonnen.

nicht von den Dehnungsreceptoren, sondern von inspiratorisch sich verstärkenden Impulsen der Aortenreceptoren stammte. In solchen Fällen findet sich, wie in der Tab. 1 angegeben, trotz der Feststellung einer totalen Endoanaesthesie ein Restwert von ΔAx von nicht mehr als 5%.

Für die genauere qualitative Analyse der Impulsbilder wurden Papierfilmbilder bei einer Geschwindigkeit von 3,55 cm/sec aufgenommen. Eine schnelle bildmäßige Übersicht erlauben jedoch geraffte Bildaufnahmen bei einer Geschwindigkeit von 0,89 cm/sec. Von beiden Arten führen wir Beispiele an.

Versuchsergebnisse

Für die Bestimmung der total endoanaesthetischen Grenzdosen bewährte sich die Kombination von *i.v. Dauerinfusion* mit i.v. Einzeldosen von DoR 9/3 besser als die früher geübte Methode der i.v. Einzelinjektion allein. Wir nehmen dabei als begünstigendes Moment an, daß die Lunge durch ihren bevorzugten Platz im Kreislauf besonders befähigt ist,

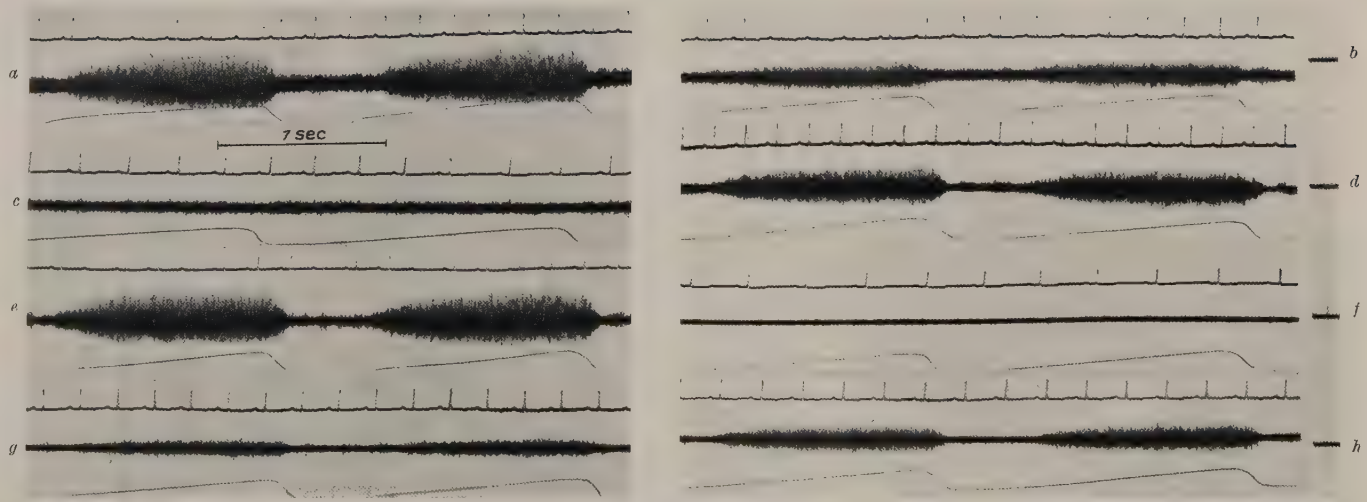


Abb. 1. Zweimal eingestellte totale und reversible Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren. Künstlich beatmete Meerschweinchen in Urethannarkose. Afferente, beatmungssynchrone Aktionsstromtätigkeit im kopfwärts durchschnittenen Halsvagus (mittlere Kurve). Kurve der künstlichen Beatmung (untere Kurve). EKG, Ableitung I (obere Kurve). *Dodecyl-polyäthylenoxyd-äther* (DoR9/3) als intravenöse Dauerinfusion und als zusätzliche Einzeldosen verabreicht. *a* Ausgangslage, *b* 30 min nach Infusionsbeginn. Gesamtmenge = 5,7 mg/kg. Deutliche partielle Endoanaesthesie, *c* 55 min nach Infusionsbeginn. Gesamtmenge = 13 mg/kg (einschl. einer Einzeldosis von 1,5 mg/kg). Totale Endoanaesthesie. Beendigung der Dauerinfusion, *d* Restitutionsgrad 105 min nach Infusionsende, *e* völlige Restitution 210 min nach Infusionsende, *f* 20 min nach Beginn der 2. Dauerinfusion. Erneute totale Endoanaesthesie. Gesamtmenge = 9,0 mg/kg (darin 2 mal 3 mg/kg als i.v. Einzeldosen), *g* Restitutionsgrad 60 min nach Infusionsende, *h* Restitutionsgrad 120 min nach Beendigung der 2. Dauerinfusion, 410 min nach Versuchsbeginn. Papiergeschwindigkeit: 3,55 cm/sec. Eichzacke: 10 μV

Pharmaka abzufangen. Wir achteten darauf, durch eine optimal gewählte Infusionsrate (mg/kg/min) die Anreicherung gerade in den Lungen zu fördern und die Nebenwirkungen am Herzen zu vermeiden.

Die immer wieder beobachteten Einzelwirkungen sollen an dem Versuchsbeispiel der Abb. 1, 2 und 3 gezeigt werden: Die Erniedrigung der aus den Lungendehnungsreceptoren stammenden Inspirationsimpulse beginnt in der ersten Versuchsphase schon bald nach dem Beginn der i.v. Dauerinfusion. Eine *minimale partielle Endoanaesthesie* (um 10% des Ausgangswertes A_{J_0}) ließ sich schon nach einer Einlaufmenge von 0,95 mg/kg DoR 9/3 nachweisen (Abb. 3). Nach 2,95 mg/kg war bereits eine deutliche Endoanaesthesie eingetreten. Nach dem Verschwinden der Impulsspindeln (Abb. 1 u. 2), festgestellt durch optische und akustische Kontrolle, wurde die Dauer infusion beendet. Die i.v. Gesamtmenge betrug 13 mg/kg. Man konnte praktisch von einer *totalen Endoanaesthesie* sprechen, als hätte man eine Durchschneidung der afferenten Lungenfasern vorgenommen. Stellte man in diesem Wirkungsstadium die Beatmungsapparatur ab, so trat eine regelmäßige zentrogene Atemtätigkeit auf. Sie bewirkte (durch Innervation der Atemmuskulatur) eine Druckschwankung an der Spiegel-Membrankapsel. Damit war bewiesen, daß die *totale Dehnungsreceptoren-Anaesthesie nicht von einer zentralen Atemlähmung oder einer peripheren, neuromuskulären Blockade der Atemmuskulatur begleitet war*. Es folgte nun das Stadium der Restitution der Dehnungsreceptoren-Aktivität bis zur Ausgangslage.

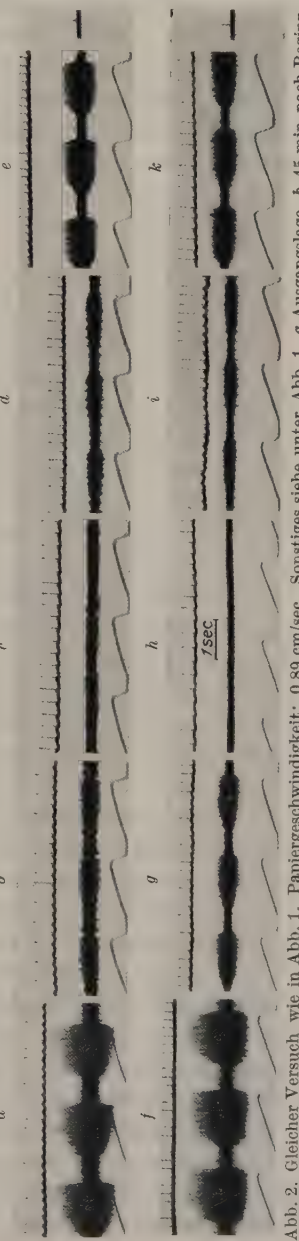


Abb. 2. Gleicher Versuch wie in Abb. 1. Papiergeschwindigkeit: 0,89 cm/sec. Sonstiges siehe unter Abb. 1. *a* Ausgangslage, *b* 45 min nach Beginn der i.v. Dauerinfusion. Gesamtmenge: 8,6 mg/kg, *c* 55 min nach Infusionsbeginn. Gesamtmenge: 13 mg (darin eine Einzeldosis von 1,5 mg/kg i.v.), *d*, *e*, *f* Restitutionsphase, 15, 90 und 215 min nach Infusionsende, *g* 15 min nach dem Beginn der zweiten Infusion. Gesamtmenge: 2,1 mg/kg, *h* totale Endoanaesthesie, 20 min nach Infusionsbeginn. Gesamtmenge: 9,0 mg/kg (darin 2 mal 3,0 mg/kg als Einzeldosen), *i*, *k* Erholungsphase 30 und 90 min nach Infusionsende

In einer zweiten Versuchsphase konnte erneut die totale Endoanaesthesie eingestellt und die Restitution beobachtet werden. Der Versuch wurde 8½ Std nach seinem Beginn abgebrochen. Beim Vergleich der beiden Versuchsabschnitte fällt auf, daß die Zeit bis zum Eintritt der vollständigen Endoanaesthesie beim erstenmal größer ist (56 min) als beim zweitenmal (20 min). In erster Linie beruht dies auf der größeren Zahl und Dosierung der Einzelinjektionen. Man kann daneben eine Kumulation mit dem noch verbliebenen unterschwelligen DoR 9/3-Rest, vielleicht auch noch eine Resthemmung im Zellstoffwechsel vermuten.

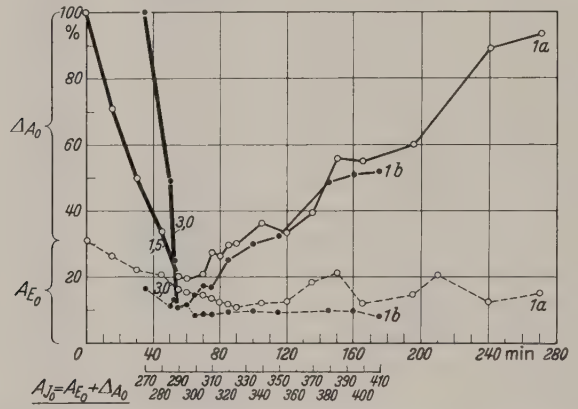


Abb. 3. Verlauf der Dehnungsreceptoren-Anaesthesie in Abhängigkeit von der Zeit (Wirkung/Zeit-Kurve). Gleicher Versuch wie in den Abb. 1 und 2. Impulsaktivität im afferenten Halsvagus, nach Fixierung auf Tonband über ein Ampèremeter integriert. Durchgezogene Kurven (——): Gesamtaktivität während der Inspirationen. Gestrichelte Kurven (- - - -): Aktivität in den Beatmungspausen. Die Kurven 1a zeigen den Endoanaesthesieverlauf im ersten, die Kurven *1b* im zweiten Versuchsabschnitt. Die dick gezogenen Kurventeile entsprechen den Strecken der i.v.Dauerinfusion, die darin eingesetzten Zahlen den zusätzlichen i.v. Einzeldosen (Milligramm/Kilogramm). Gesamtmengen siehe in Tab. 1

Würde man in den verschiedenen Versuchen für die Festlegung der Endoanaesthesiedauer die Zeitspanne vom primären bis zum sekundären 50%igen Endoanaesthesiegrad (50% von A_{J_0}) wählen, dann ergäben sich sehr verschieden große Zeiten, in unserem Falle 183 min gegenüber 102 min. Vergleicht man jedoch die Restitutionsstrecken vom Zeitpunkte der vollständigen Endoanaesthesie an bis zu einem Restitutionswert von 50% der Ausgangslage A_{J_0}, dann ergibt sich in unserem Beispiel fast der gleiche Wert (89 bzw. 92 min). Die gleichgroße Eliminationsgeschwindigkeit ist schon aus der fast gleichen Anstiegsgeschwindigkeit der beiden Restitutionskurven zu schließen.

Wir wählten deshalb als Maß der *Endoanaesthesiedauer* die *Zeit zwischen dem Wirkungsmaximum und dem 50%igen Restitutionswert*, bezogen auf die Ausgangslage A_{J_0}. Die Bedingungen sind damit der Lokalanaesthesie angenähert.

Während der Restitutionsphase fiel uns eine geringe Ungleichmäßigkeit in den Wirkung/Zeit-Kurven auf (siehe Abb. 4). Die Erholungsphase zeigt Stufen, teilweise sogar Gipfel. Sie scheinen mit der wechselnden hämodynamischen Erholungstendenz zusammenzuhängen, denn DoR 9/3 wirkt in der gewählten Dosierung depressorisch.

Bemerkenswert war auch das *Verhalten der Restaktivität in der Beatmungspause* („Zwischenstrecke"). Sie wurde gleichfalls erniedrigt und in der Erholungsphase wieder erhöht. Im zweiten Versuchsabschnitt senkte sich die Restaktivität bis fast auf den Störpegel der Apparatur (Abb. 1, 2). Man konnte hierbei nicht nur von einer totalen Dehnungsreceptoren-Anaesthesie, sondern auch von einer totalen Endoanaesthesie aller durch den Vagus gemeldeten Receptoren sprechen.

Im Verlaufe der sich vertiefenden Endoanaesthesie kamen in verschiedenen Versuchen immer deutlicher EKG-synchrone Impulsserien zum Vorschein, die auch akustisch als rhythmische Geräusche hörbar waren. Sie besaßen keilförmige Gestalt und begannen mit ihren maximalen Amplituden dicht hinter dem QRS-Komplex des EKG. Damit wiesen sie sich als Depressorimpulse aus, die aus den Aortenreceptoren stammten. Im Stadium der totalen Endoanaesthesie der Dehnungsreceptoren glich das Aktionsstrombild vielfach dem eines alleinigen Depressornerven, so daß die Endoanaethesie im Sinne einer *„pharmakologischen Präparation des Depressornerven"* gewirkt hatte. Die Aortenreceptoren wurden also anscheinend weniger beeinflußt als die Lungendehnungsreceptoren. Trotzdem ist nicht ohne weiteres eine selektive Ausschaltung der Lungensensibilität anzunehmen. Von besonderer Bedeutung ist vielmehr die Tatsache, daß die Lungen an einem Querschnitt des gesamten Kreislaufes sitzen und dem Blute einen größeren Teil des Endoanaestheticums entnehmen können als die dahinter geschalteten Organe. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die Endoanaesthesie durch eine nicht zu hohe Infusionsrate (d. h. nicht durch Übertitrierung) eingestellt, und ein Übergang sehr großer Stoffmengen über die Lungen hinaus vermieden wird. Die zweite Versuchsphase zeigt jedoch (Abb. 1 u. 2), daß nicht nur die Impulse der Dehnungsreceptoren, sondern zuletzt auch die aller anderen im Vagusnerven laufenden afferenten Fasern verschwinden, so daß die völlige Endoanaesthesie des durch Ableitung erfaßten Ursprungsgebietes in einer leeren Linie, d. h. dem Störpegel des Verstärkers zum Ausdruck kommt. In der Restitution kehren Dehnungsreceptoren- und die übrigen Impulse gleichermaßen wieder. Die i.v. Verabreichung des Endoanaestheticums bevorzugt also vor allem wegen der günstigen hämodynamischen Bedingungen die Lungenreceptoren.

Die fortlaufende Registrierung des Endoanaesthesieverlaufes durch einen *Universalschreiber* der AEG auf Metallpapier brachte uns einen

weiteren Fortschritt in der Kontrolle und Beeinflussung des Endoanaesthesieverlaufes. Im Versuchsbeispiel der Abb. 5 finden wir bei langsam laufendem Papier (0,165 cm/min) alle Ampèremeterausschläge zu einer *Wischkurve* vereinigt. Der Anfangsteil der Kurve gibt den exponentialen Abfall der Dehnungsreceptoren-Aktivität wieder. Je nach der gewählten Infusionsrate, die von uns möglichst unter der herzschädigenden gehalten wurde, stellt sich eine solche Kurve entweder im Sinne einer partiellen oder einer totalen Endoanaesthesie der Dehnungsreceptoren auf einen horizontalen Verlauf ein. Man kann nun durch eine Steigerung der Infusionsrate oder durch die Injektion zusätzlicher i.v. Einzeldosen die Endoanaesthesie weiter vertiefen. Nach unseren Erfahrungen wählten wir meist das letztere Vorgehen. Im abgebildeten Beispiele wurde die totale Endoanaesthesie der Dehnungsreceptoren auf diese Weise durch zusätzliche i.v. Einzelgaben (2 mg, 2 mg und 1 mg/kg) erreicht. Nach Abstellung der Dauerinfusion erholte sich die Impulstätigkeit der Dehnungsreceptoren bis auf 65% des Ausgangswertes. Zum Vergleich könnte man die Strichkurve einzeichnen, die sich durch Auswertung der Tonbandaufnahmen über das „Multavi 5" von Hartmann und Braun

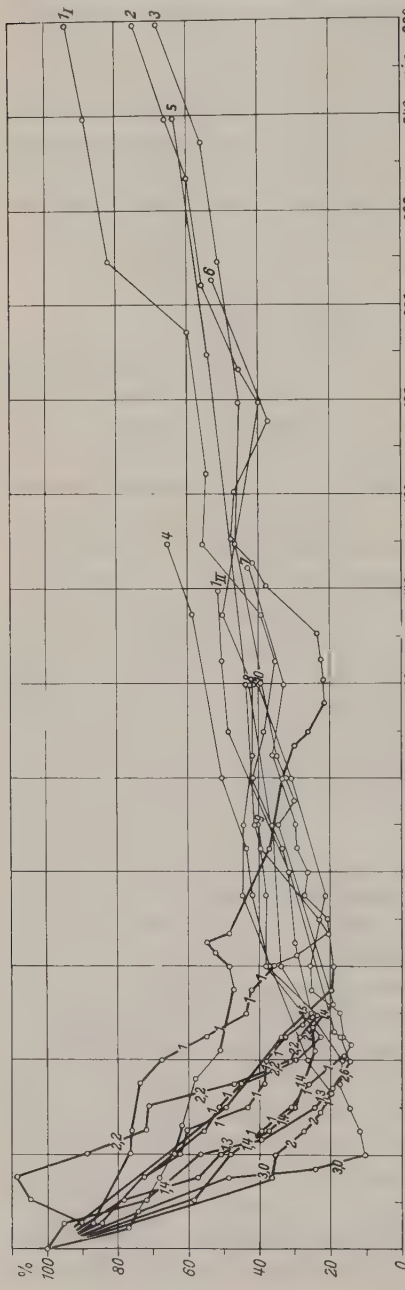


Abb. 4. Wirkung/Zeit-Kurven für die in der Tab. 1 aufgeführten Versuche zur Endoanaesthesie der Lungendehnungsreceptoren. Gesamtmengen: siehe Tab. 1, sonstige Angaben: siehe Abb. 3.

ergab, worauf wir jedoch der Übersichtlichkeit halber verzichten. Bis auf kleine Abweichungen decken sich beide Kurven recht gut. Im ganzen ist die Anwendung des Direktschreibers vorteilhaft, weil man während des Versuchsablaufes die geeignetsten Zeitpunkte feststellen und auswählen kann, in denen zur Erreichung der völligen Endoanaesthesie i.v. Einzelgaben zu empfehlen sind.

Ein *Übersichtsbild über alle Wirkung/Zeit-Kurven* gibt die Abb. 4. Sie umfaßt 11 Versuche bei i.v. Infusionsraten zwischen 0,13—0,2 mg/kg/min und von Fall zu Fall wechselnden zusätzlichen Einzeldosen. Die jeweiligen Gesamtmengen von DoR 9/3 sind aus der Tab. 1 zu ersehen. Vorweg

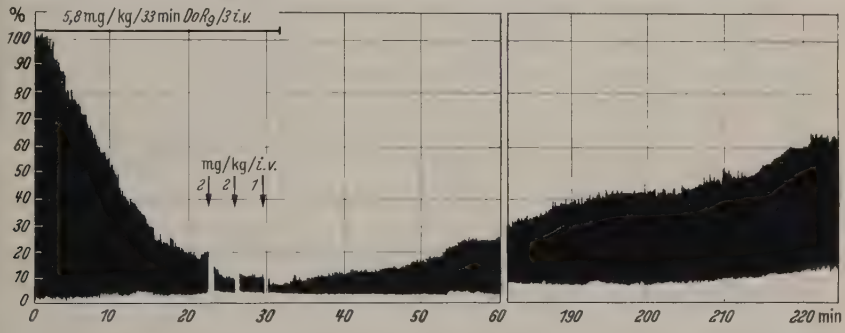


Abb. 5. Ablauf der Dehnungsreceptoren-Anaesthesie eines Meerschweinchens in Urethannarkose. Kurve der fortlaufenden Registrierung mittels des integrierenden Verfahrens (Zwischenverstärker und Universalschreiber der AEG). Die „Wischkurve" entspricht dem Versuch 2 in der Abb. 4 und der Tab. 1

kann gesagt werden, daß innerhalb des angegebenen Bereichs der Infusionsraten keine deutliche Beziehung zum Kurvenabfall erkennbar war. Erst die i.v. Einzeldosen variieren den Kurvenabstieg erheblich. Mit der Injektion der Einzeldosen wird am besten dann begonnen, wenn am Universalschreiber der Übergang der Kurve in die Horizontale erkennbar ist. Mit diesem variierten Vorgehen war es uns möglich, nach 32½—60 min den maximalen Effekt herbeizuführen. Die Kurve 6 der Abb. 4 zeigt deutlich, wieviel länger es dauert, wenn man auf die zusätzlichen Einzelgaben verzichtet. Die Elimination verzögert den Eintritt der Endoanaesthesie bis zur 116. min. Selbstverständlich ist es möglich, durch eine höhere Infusionsrate einen schnelleren Eintritt der Endoanaesthesie zu erzwingen. Dabei besteht ebensosehr die Gefahr der „Übertitration", wie der Herzschädigung. Unser Ziel war hingegen, die total endoanaesthesierende Dosis möglichst klein und frei von Herzwirkungen zu halten.

Die *minimale partielle Endoanaesthesie der Dehnungsreceptoren* (10% des Ausgangswertes A_{J_0}) trat bei einer *Grenzdosis* von 0,3—1,3 mg/kg (Tab. 1), im Mittel bei 0,72 mg/kg ein. Dieser Wert befindet sich in guter Übereinstimmung mit unseren früheren Versuchen, in denen wir mit i.v. Einzeldosen eine Grenzdosis von 1 mg/kg fanden (Zipf u. Kreppel,

1955). Bei der Feststellung der *totalen Endoanaesthesie der Dehnungsreceptoren* verglichen wir die Leuchtschirmbeobachtung, das Bildmaterial, sowie den akustischen Eindruck während des Versuchsablaufes und während der Wiedergabe der Tonbandaufnahmen mit dem Verhalten des „integrierenden" Ampèremeters („Multavi 5" oder „Universalschreiber AEG"). Wir fanden an Hand unseres Materials, daß die Leuchtschirmbilder und die Filmpapieraufnahmen eine ebenso genaue Feststellung der totalen (und minimal partiellen) Dehnungsreceptoren-Anaesthesie erlaubten, wie die zusätzliche Technik. Sie konnte dann angenommen werden, wenn die beatmungssynchrone Lungendehnung keine rhythmischen Erhebungen der Aktionsimpulse über die Restaktivität während der „exspiratorischen" Beatmungspausen erzeugte.

Die *Restitutionsphase* nach Beendigung der Zufuhr von DoR 9/3 zeigte bei allen Versuchen einen recht ähnlichen Verlauf. Wir konnten nicht in allen Fällen eine Restitution über 50% des Ausgangswertes A_{Jo} erreichen, wahrscheinlich weil während der langen Versuchszeiten der Nerv gelitten hatte. Im einzelnen ergaben sich Verzögerungen, die wohl das Ergebnis des in Stufen sich vollziehenden Wiederanstiegs des Blutdrucks darstellen. Die Ausspülung des Endoanaestheticums ist den entsprechenden Schwankungen der Lungendurchblutung unterworfen. Es kann angenommen werden, daß der stabile Körper in einem einfachen physikalisch-chemischen Mechanismus aus dem „Depot Lunge" eliminiert und zunächst in die übrigen Körpergewebe abgelagert wird, so daß für einen zweiten Versuchsabschnitt mit einer Kumulation zu rechnen ist.

Berücksichtigen wir die Versuche, in denen eine totale oder fast totale Dehnungsreceptoren-Anaesthesie erreicht wurde, dann ergeben sich Werte für die *Endoanaesthesiedauer* ($E_{\max}$ bis zu 50% des Ausgangswertes A_{Jo}), die zwischen 84 und 105 min, im Mittel bei 97 min liegen (Tab. 1). Wir können daraus ableiten, daß allgemein die Restitution mit etwa gleicher Anstiegsgeschwindigkeit verläuft, und daß sich vom Punkte der totalen Endoanaesthesie an eine annähernd gleiche Endoanaesthesiedauer von etwa 1½ Std ergibt. Eine so lange Endoanaesthesiedauer läßt sich mit den bisherigen Lokalanaesthetica nicht einstellen.

Die *Beeinflussung der Impulsaktivität des Halsvagus während der „exspiratorischen", besser gesagt der Beatmungs-Pause,* zeigt prinzipiell eine Übereinstimmung mit dem Verhalten der Afferenzen in der Beatmungsphase („Inspiration"). Von niedrigeren Ausgangswerten ab sinkt die Aktivität zu den gleichen Zeitpunkten auf ein Minimum. Die Endoanaesthesie der Dehnungsreceptoren läßt vielfach andere Afferenzen z. B. die Depressorimpulse deutlich hervortreten. Deren Auftreten war uns ein guter Anhaltspunkt für die Feststellung einer totalen Endoanaesthesie der Dehnungsreceptoren. Die Erholung erfolgt in den einzelnen

Versuchen mit angenäherten Geschwindigkeiten und einer zeitlichen Parallele zu den inspirationsbedingten Impulsspindeln.

In unseren Versuchen ließen sich nur *geringe Änderungen im EKG* feststellen. Übereinstimmend zeigte sich bei allen Tieren zum Zeitpunkt der maximalen Endoanaesthesie eine Bradykardie (siehe auch Abb. 1). Die Herzfrequenz sank im Mittel von 300 auf 230 Schläge pro Minute ab. In der Restitutionsphase stieg die Frequenz wieder an und erreichte in 4 Fällen den Ausgangswert bzw. überschritt ihn. Am *QRS-Komplex* ließ sich eine geringe Tendenz zur *Verbreiterung* erkennen. Die Überleitungszeit nahm mit zunehmender Endoanaesthesie gering zu, ohne abnorme Werte zu erreichen. Auch hier ergab sich in der Erholungsphase eine Rückbildung. Die *Endteile* des EKG zeigten eine leichte Tendenz zur Negativität, auch hier war die Rückbildung deutlich. Man muß berücksichtigen, daß die lang andauernde Narkose nicht ohne Einfluß auf das EKG bleiben kann.

Die in Vorversuchen durch Überdosierung mit DoR9/3 und durch zu starke Urethannarkose aufgetretenen pathologischen EKG-Formen bestanden in zunehmender Verbreiterung von QRS bis zur Form eines Rechtsschenkelblocks. Meist entwickelte sich anschließend ein partieller, dann totaler AV-Block, der zum Exitus führte. In anderen Fällen trat zum Rechts- ein Linksschenkelblock hinzu. Bei dieser letzteren, immerhin schwersten Deformierung erfolgte eine Rückbildung in umgekehrter Reihenfolge, wobei sich das EKG wieder der Ausgangslage näherte.

Besprechung

Der *methodische Wert* unserer Untersuchungen besteht darin, daß es jetzt möglich ist, den Verlauf der Endoanaesthesie für jeden Zeitpunkt des Versuches direkt zu registrieren und die Änderungen des Wirkungsgrades in Abhängigkeit von der Zeit als Wirkung/Zeit-Kurve darzustellen. Man braucht sich nicht mehr auf photographische Stichaufnahmen zu beschränken und ist in der Lage, die Zeitpunkte des Wirkungseintritts, -maximums, des Restitutionsbeginns und -endes deutlich festzulegen. Der Versuch läßt sich in jeder einzelnen Phase genau übersehen, und geplante Maßnahmen oder Variationen können an den geeignetsten Stellen in den Versuchsverlauf hineingezielt werden. Die akustische Fixierung auf Tonband ermöglicht schließlich beliebig oft die akustische Reproduktion, aber auch die optische Rückdarstellung auf dem Leuchtschirm des Kathodenstrahloszillographen. Es gibt zwar schon ein integierendes Verfahren, das für Messungen am Karotissinusnerven angewandt wurde (Gernandt, Liljestrand und Zotterman (1946), Liljestrandt und Zotterman (1955), Zottérman (1956). Es wurden auch Wirkung/Zeit-Kurven der Dehnungsreceptoren-Anaesthesie veröffentlicht (s. bei Lanz, sowie Bein und Bucher). Es bestand aber keine Möglichkeit, eine solche Endoanaesthesie nicht nur stundenlang zu verfolgen, sondern auch fortlaufend zu registrieren. Diese Methode arbeitete an faserarmen Präparaten. Die verschiedenen Impulsarten

bzw. die Gesamtzahl der Impulse wurden ausgezählt. Ihre geringe Dichte erlaubt nicht die Anwendung unserer vereinfachten, „integrierenden" Methode, die geradezu an eine genügend dichte Impulsfolge, d. h. an faserreiche Präparate, bzw. an den Gesamtnerven gebunden ist. Vorläufig wandten wir sie für die Registrierung der Lungenreceptoren an, wobei die Änderungen der Dehnungsreceptoren-Impulse schon wegen ihrer atemsynchronen Abhängigkeit besonders leicht erfaßt werden können. Wenn auch unser „integrierendes" Verfahren kein vollständiges sein kann, so liefert es doch eine reproduzierbare Bezugsgröße, an deren Änderungen das Ausmaß, der Eintritt und das Ende der ins Auge gefaßten Wirkung abgelesen werden kann. Damit sind die Voraussetzungen gegeben für die Bestimmung der minimalen und maximalen Wirkung, der Wirkungsdauer und der entsprechenden Dosenschwellen. *Es können also Endoanaesthetica in ähnlicher Weise ausgewertet werden wie Lokalanaesthetica an der Hornhaut, Schleimhaut und am Nerven.*

Der *pharmakologische Charakter des Dodecyl-polyäthylenoxyd-äthers als Endoanaestheticum* wird durch die quantitative Erfassung mit unserer Methode erheblich klarer. Der Wirkungseintritt (10% von A_{J_0}) beginnt später als bei den bekannten Lokalanaesthetica, durchschnittlich nach 4,3 min (Tab. 1). Die minimal endoanaesthetische (partielle) Dehnungsreceptoren-Anaesthesie setzt durchschnittlich bei 0,72 mg/kg DoR9/3 ein, die totale Endoanaesthesie wird erreicht ab 11 mg/kg i.v. Die Wirkungsdauer der totalen Endoanaesthesie beträgt durchschnittlich 1½ Std. Bemerkenswert ist die geringe Herzgiftigkeit von DoR9/3, verglichen mit Procain (Novocain WZ). Nach Untersuchungen von Zipf u. Kreppel (1955), Kreppel (1953), sowie Ludwig (1956) ergaben sich Änderungen des EKG beim urethanisierten Meerschweinchen im Sinne einer leichten und flüchtigen Bradykardie ab 5 mg/kg, mittelschwere im Sinne einer stärkeren reversiblen Bradykardie und einer Verlängerung der Endteile erst ab 15 mg/kg und schwere im Sinne von Vorhof-Kammerblock und Kammerstillstand erst ab 30 mg/kg i.v. In unseren eigenen Versuchen mit der Methode der Dauerinfusion + Einzeldosen sahen wir verhältnismäßig geringe und schnell reversible Änderungen am EKG im Sinne einer Bradykardie, einer Verbreiterung des QRS-Komplexes und einer Abflachung der Endstücke des EKG. Mit Procain, dem ungiftigsten der bisherigen Lokalanaesthetica, kann man eine totale Endoanaesthesie nur unter erheblichen chinidinartigen Herzschädigungen herbeiführen (Zipf u. Miestereck, 1953, sowie Zipf, 1953). Natürlich hängt bei beiden Stoffen die Nebenwirkung auf das Herz von der Infusionsrate bzw. Injektionsgeschwindigkeit ab. So sind für Procain flüchtige Änderungen des EKG schon ab 4 mg/kg i.v. bei Hunden (Long, Oppenheimer, Wester u. Durant, 1949), sowie zwischen 5—10 mg/kg bei Katzen in Dialnarkose (Szekely u. Wynne, 1954) beschrieben worden.

Wir sind uns darüber klar, daß Pharmaka entwickelt werden könnten, die noch einen besseren Index $\left(\frac{\text{endoanaesthetische Grenzdosis i.v.}}{\text{DL}_{50}\text{ i.v.}}\right)$ aufweisen als DoR9/3. Immerhin ist er nach Untersuchungen von Zipf, Wetzels, Ludwig und Friedrich (1957) schon bei diesem Stoff $\left(\frac{1\text{ mg/kg i.v.}}{38\text{ mg/kg i.v.}}\right)$ günstiger als bei Procain $\left(\frac{2\text{ mg/kg i.v.}}{50\text{ mg/kg i.v.}}\right)$.

Bucher (1956) hat neuerdings Untersuchungen mitgeteilt, in denen Polyäthylenoxydäther als Schlepper für Butylaminobenzoesäure benutzt wurde. Mit etwas anderer Methodik und Dosierung, sowie unter Heranziehung der Trachealverschlußreaktion konnte er besonders mit KM 65 (Tessalon WZ) die Dehnungsreceptoren weitgehend ausschalten.

Es ist bisher mit keinem Stoff gelungen, ohne ernste EKG-Änderungen eine endovasale, totale und reversible Ausschaltung der Lungendehnungsreceptoren mit so niedriger i.v. Gesamtdosis herbeizuführen. Zu beachten ist bei der Stabilität von DoR9/3 die längere Wirkungsdauer, nicht nur im Hinblick auf die inneren sensiblen Receptoren, sondern auch auf die depressorischen und anderen Organ-Wirkungen. Mit Kumulationserscheinungen ist also zu rechnen. DoR9/3 ist das erste Netzmittel, das für eine interne, ja sogar endovasale Therapie in Betracht gezogen werden kann. Seine Stabilität läßt annehmen, daß es, auch per os gegeben, eine endoanaesthetische Wirkung ausübt. Tatsächlich konnte eine solche in Stichversuchen am Meerschweinchen bei 35 mg/kg oral nachgewiesen werden (noch nicht veröffentlicht). Mit der gleichen oralen Dosis ergab sich auch ein starker antiphlogistischer Effekt am Formalinödem der wachen und narkotisierten Ratte (Wolf, 1956).

Bei der Analyse der durch die Anaesthesie mit DoR9/3 ausgeschalteten Lungenreceptoren weisen wir zunächst auf den Extremfall hin, wie er in der Abb. 3 (Kurve *1b*) dargestellt ist. Hier wurde bei der Wiederholung der Endoanaesthesie im zweiten Versuchsabschnitt der Effekt bis fast auf den Störpegel der Apparatur vertieft. Es handelt sich um ein Verschwinden aller im Halsvagus verlaufenden Afferenzen, einschließlich der von den Aortenreceptoren ausgehenden Depressorimpulse. Es fehlen alle Lungenreceptoren-Impulse. Dies bedeutet, daß nicht nur die physiologischerweise tätigen Lungendehnungsreceptoren vom $A\alpha$ und $A\beta$-Typ, sondern auch solche vom B_1-Typ gelähmt sein müssen, die nach de Molina und Wyss an der gewöhnlichen Atemsteuerung nicht teilnehmen, sondern erst bei Lungenkollaps, Pneumothorax, Thorakotomie und ähnliche Zuständen in Tätigkeit treten. Von diesem Extremfall abgesehen, kann man schon an der übrigbleibenden Depressortätigkeit deutlich erkennen, daß die Dehnungsreceptoren nicht nur während der Lungenblähung, sondern auch während der Beatmungspause ausgeschaltet sind. Diese Bevorzugung vor den Aortenreceptoren bedeutet aber keine selektive Beeinflussung. Sie muß der besonders hohen

Abfangquote der den ganzen Kreislaufquerschnitt beherrschenden Lungen zugeschrieben werden. Man kann annehmen, daß an anderen inneren Organen sich eine andere Reihenfolge in der Ausschaltung der inneren sensiblen Receptoren ergibt. Hier werden Untersuchungen an weiteren Systemen, etwa an den Presso- und Chemoreceptoren des Karotissinus-Gebietes Aufschluß geben. Im Hinblick auf eines der therapeutischen Wunschziele ist anzunehmen, daß die Dehnungsreceptoren-Anaesthesie eine der wesentlichen Voraussetzungen für das Zustandekommen des Hustens, nämlich die Dehnungsreceptoren-Erregung, dämpft.

Summary

Blockade of pulmonary-stretch-receptors has been produced in guinea-pigs under artifical respiration and urethan by *Dodecyl-polyäthylenoxyd-ether*. This was administered either by a long lasting intravenuous infusion alone or by adding further amounts intravenously at intervals. This blockade of stretch-receptors which depends on the total dose administered can be controlled at will as a partial or complete endoanaesthesia. There was virtually no change of ECG. The endoanaesthesia was reversible and it took about 1½ hrs until the maximum blockade had been reduced to 50%. The minimum dose producing partial endonaesthesia was 0.7 mg/kg i.v. The dose producing complete, endoanaesthesia was 11 mg/kg i.v.

The whole course of endoanaesthesia and recovery from it was continuously recorded by a special procedure and plotted as a curve against time.

Literatur

Bein, H. J., u. K. Bucher: Helv. Physiol. Acta **15**, 55 (1957). — Bucher, K.: Schweiz. med. Wschr. **1956**, 94. — Gernandt, B., G. Liljestrand u. Y. Zotterman: Acta Physiol. Scand. **11**, 230 (1946). — Kreppel, E., u. H. F. Zipf: Arch. internat. pharmacodyn. thérap. **101**, 279 (1955). — Lanz, U.: Helvet. physiol. pharmacolog. acta **10**, 62 (1952). — Liljestrand, G., u. Y. Zotterman: Acta Physiol. Scand. **35**, 380 (1955). — Long, I. H., M. I. Oppenheimer, M. R. Wester and Th. M. Durant: Anesthesiology **10**, 406 (1949). — Ludwig, H.: Inaug. diss. 1956. Pharmakologisches Institut der Universität Bonn. — Raule, W.: zit. nach Marguth, H., W. Raule u. H. Schaefer: Pflügers Arch. Physiol. **254**, 224 (1951). — Molina, A, F. de und O. A. M. Wyss: Helv. physiol. Acta, **8**, (1950): 464 — Schaefer, H.: Erg. Physiol. **46**, 71 (1950). — Szekely, P., and N. A. Wynne: Brit. Heart J. **16**, 267 (1954). — Wolf, I.: Inaug. diss. 1956. Institut für Veterinär-Pharmakologie und experimentelle Pathologie der Freien Universität Berlin. — Zipf, H. F.: Klin. Wschr. **1953**, 97. — Zipf, H. F., u. E. Kreppel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 340 (1955). — Zipf, H. F., u. H. Miestereck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 456 (1953). — Zipf, H. F., E. Wetzels, H. Ludwig u. M. Friedrich: Arzneimittel-Forsch. **7**, 162 (1957). — Zotterman, Y.: Acta Physiol. Scand. **37**, 60 (1956).

Prof. Dr. med. H. F. Zipf, Institut für Veterinär-Pharmakologie und experimentelle Pathologie der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem, Bitterstr. 14—16

Dr. med. P. Reichertz, Medizinische Poliklinik der Universität Bonn, Bonn, Wilhelmstr. 35—37

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 111—118 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Kreislaufreaktionen beim „Tiefen Atemzug"

Von
U. Wagenmann, E. Gerstenberg, E. Schmid und R. Taugner

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. März 1957)

Atmungsabhängige Kreislaufreaktionen kommen nicht nur bei normaler Atmung, sondern auch beim sogenannten tiefen Atemzug vor; sie sind hier sogar noch wesentlich deutlicher ausgeprägt. Das Studium des „tiefen Atemzugs" (TA) scheint daher zur weiteren Aufklärung der funktionellen Verknüpfung von Atmung und Kreislauf geeignet. Dabei interessiert vor allem das Verhalten des Fördervolumens und des peripheren Gefäßwiderstandes, deren Bedeutung selbst für die Entstehung der normalen respiratorischen Arrhythmie und respiratorischen Blutdruckschwankungen im einzelnen noch strittig ist (Bauereisen; Matthes; Schroeder u. Mitarb.; Gerstenberg u. Mitarb.). Ein zweckdienlicher Vergleich mit den Verhältnissen bei normaler Atmung setzt allerdings voraus, daß die Kreislaufreaktionen während eines TA nur graduell und nicht prinzipiell von denen bei normaler Atmung verschieden sind. Nach den vorliegenden Ergebnissen treffen diese Voraussetzungen tatsächlich zu.

Unsere Versuche verfolgen neben dieser rein physiologischen Fragestellung aber auch gewisse praktisch-pharmakologische Zwecke: TA werden beim wachen Hund durch verschiedene Pharmaka, z. B. Nicotin, Lobelin, Adenosin- und Theophyllinkörper, Acetylcholin, Histamin und Nitrite, ausgelöst. Die mit der Atmungserregung verknüpften Kreislaufreaktionen erschweren aber die Beurteilung der spezifischen Kreislaufwirkung vor allem, wenn es sich um kurzwirkende Stoffe handelt. Erst die genauere Kenntnis des TA würde in solchen Fällen seine Abgrenzung gegenüber den eigentlichen, nicht atmungsabhängigen Kreislaufwirkungen erlauben.

Methodik

Die Versuchsanordnung am wachen Hund entsprach der früherer Experimente (Gerstenberg u. Mitarb.). Es sei darauf hingewiesen, daß zur Ermittlung der Herzfrequenz der reziproke Wert der wahren Pulsdauer τ, zur Berechnung des

peripheren Gefäßwiderstandes W_2 aber der nach Schroeder u. Brehm korrigierte Wert τ_2 diente. In einigen Versuchen wurde die Durchblutung der vorderen Extremität mit dem Plethysmographen von Schroeder registriert. Zur Auslösung der TA verwendeten wir Nicotin (2—10 γ/kg), Lobelin (2—20 γ/kg), KCN (2—10 γ/kg) und ATP (25—200 γ/kg). Die Dauer der i.v. Injektionen betrug 5—15 sec. Insgesamt wurden Einzelpulsanalysen an 10 durch Pharmaka ausgelösten TA von 5 Hunden vorgenommen.

Versuchsergebnisse

Am Menschen sind im allgemeinen die Kreislaufreaktionen bei willkürlich ausgelösten, in seltenen Fällen auch die bei spontanen TA (Seufzern) studiert worden. Beim Hund kommen zwar ebenfalls spontane TA

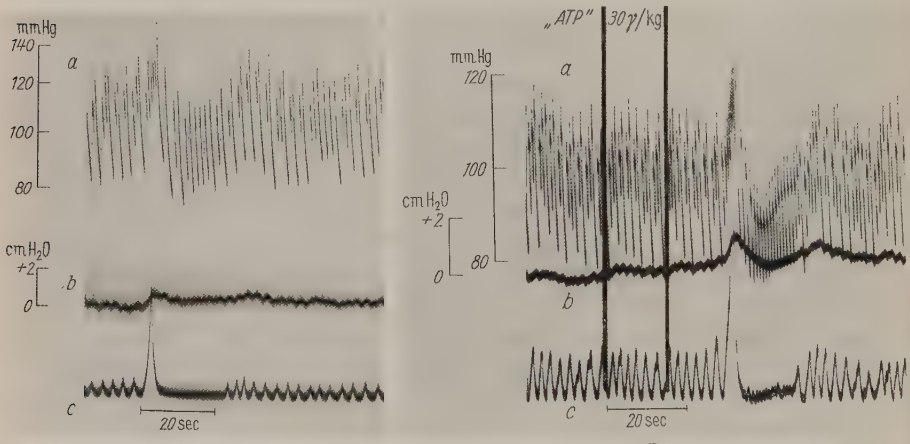


Abb. 1 A Spontaner, 1 B medikamentös ausgelöster tiefer Atemzug bei Hund Senta II (25 kg) und Senta I (26 kg). Zwischen den Lichtmarken (Abb. B) i.v. Injektion von 30 γ ATP/kg. *a* Carotisdruck; *b* Druck im Vorderpfoten-Plethysmographen; *c* Atmung. Die feinen Zacken auf der Atmungskurve sind durch den Herzschlag bedingt

vor; sie können wegen ihrer Seltenheit aber nicht systematisch untersucht werden. Erst mit Hilfe bestimmter Pharmaka ist es auch hier möglich, regelmäßig TA auszulösen. Die damit verknüpfte Kreislaufreaktion ist mit der beim spontanen TA identisch (Abb. 1 A u. B).

Die durch Pharmaka erzeugten TA traten 20—30 sec nach Injektionsbeginn auf und hatten — unabhängig von dem verwendeten Pharmakon — die gleiche Form: Die Inspiration war wesentlich vertieft, die exspiratorische Apnoe um ein Vielfaches verlängert (Abb. 1—3). Die folgenden 3—5 Atemzüge waren gewöhnlich unregelmäßig. Bei höheren Dosen besonders von Lobelin, KCN und Nicotin traten vor der Apnoe mehrere vertiefte Atemzüge auf (Abb. 3).

Die zur Auslösung der TA verwendeten Pharmaka erzeugten in der angegebenen Dosis keine oder, wie Histamin und Acetylcholin, doch nur

sehr schwache eigene Kreislaufeffekte. Die mittelbaren atmungsabhängigen Kreislaufreaktionen waren bei den verschiedenen Tieren prinzipiell gleich und von der Art des verwendeten Pharmakons unabhängig. Sie stellten im wesentlichen eine Verstärkung der normalen

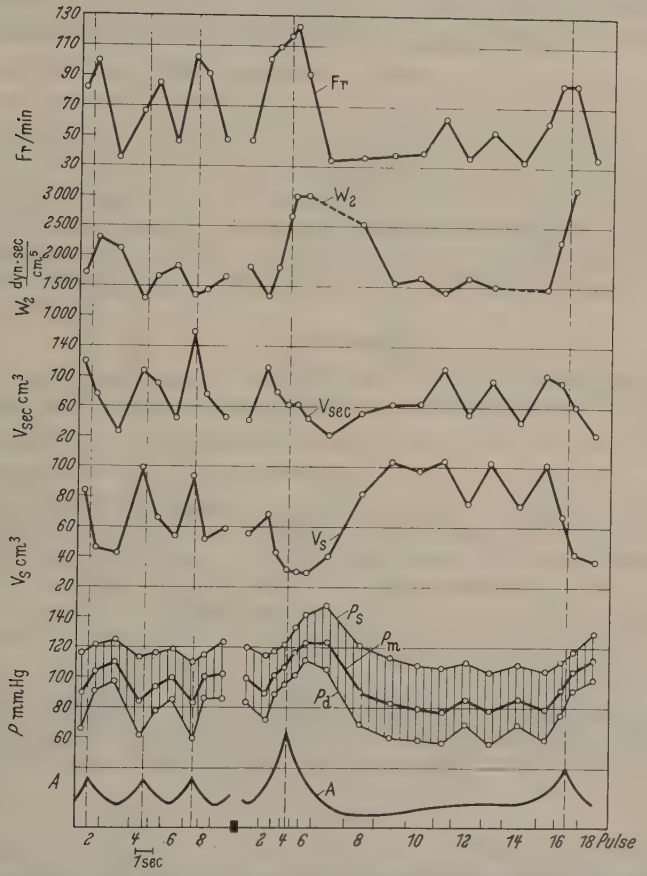


Abb. 2. Hund Karo, 24 kg. 3 normale Atemcyclen und tiefer Atemzug mit Apnoe nach i.v. Injektion von 120 γ ATP/kg. Injektionszeit 10 sec. Der tiefe Atemzug erfolgte etwa 30 sec nach dem in der Abbildung nicht mehr enthaltenen Injektionsbeginn. Die gestrichelten senkrechten Linien markieren jeweils den Umschlag von Inspiration in Exspiration. Einzelpulsanalyse nach WEZLER u. BÖGER, modifiziert nach SCHROEDER

Fr Herzfrequenz; W_2 peripherer Gefäßwiderstand; V_{sec} Sekundenvolumen; V_s Schlagvolumen; *P* Carotisdruck; P_s systolischer, P_d diastolischer, P_m Mitteldruck; *A* Atmung (Inspiration = Ausschlag nach oben). Zwischen zwei gestrichelt verbundenen Kurvenpunkten von W_2 wurde jeweils ein Meßpunkt ausgelassen, weil das nach SCHROEDER korrigierte τ_2 zu stark von τ abwich

respiratorischen Arrhythmie und respiratorischen Blutdruckschwankung dar (Abb. 1—3, vgl. GERSTENBERG u. Mitarb.).

Der Anstieg des *Mitteldrucks* begann in der Mitte der Inspiration und reichte bis zum 2.—4. Puls der Exspirationsphase. Das Druckmaximum

lag beim TA — dem länger dauernden und etwas steileren Anstieg entsprechend — wesentlich höher als bei den vorausgegangenen normalen Atemzügen. Der Mitteldruck fiel anschließend für die Dauer der Apnoe unter den Ausgangswert. Der diastolische Druck reagierte stärker als der systolische, die *Amplitude* nahm daher inspiratorisch ab und exspiratorisch zu. Auch die Änderungen der *Herzfrequenz* stellten eine Steigerung

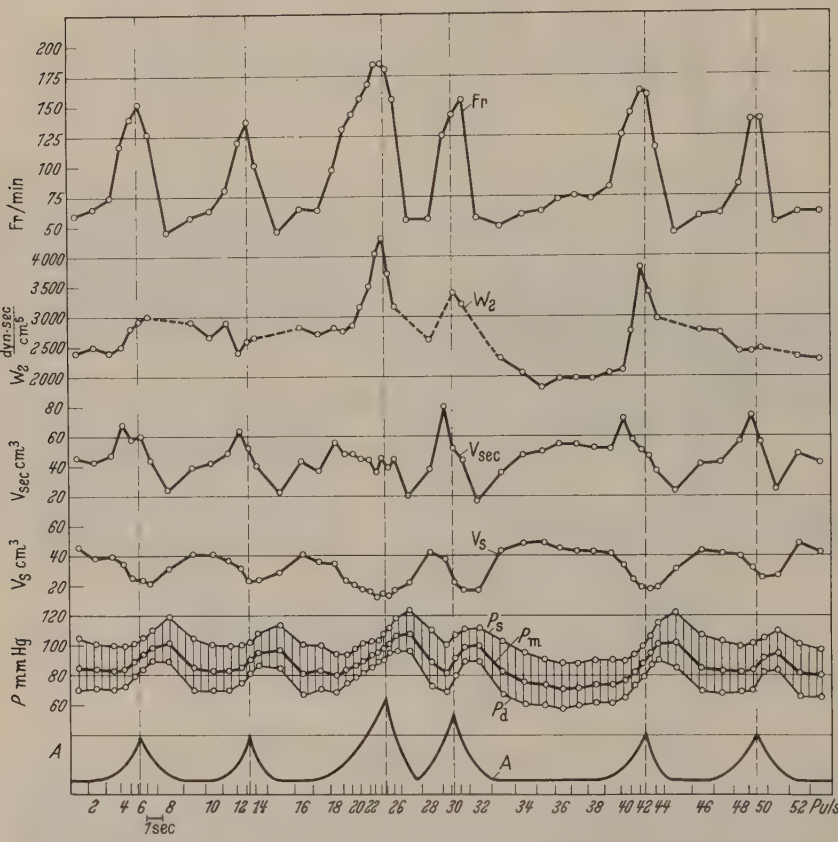


Abb. 3. Hund Hella, 22 kg. 2 tiefe Atemzüge mit verlängerter Apnoe nach i.v. Injektion von 2,5 γ Nicotin/kg in 15 sec. Beginn der Atmungserregung etwa 30 sec nach dem in der Abbildung nicht mehr enthaltenen Injektionsbeginn. (Weitere Legende s. Abb. 2)

der normalen respiratorischen Arrhythmie dar (vgl. Gerstenberg u. Mitarb.). Das *Schlagvolumen* nahm im wesentlichen inspiratorisch ab und exspiratorisch zu; es blieb während der Apnoe auf dem erhöhten Wert. Im Gegensatz zur normalen Atmung lief das *Sekundenvolumen* beim TA eher mit dem Schlagvolumen als mit der Herzfrequenz parallel: Es fiel schon während der vertieften Inspiration ab, um erst in der Apnoe

langsam wieder anzusteigen (Abb. 2 und 3). Das Sekundenvolumen übertraf dabei gelegentlich die höchsten bei normaler Atmung vorkommenden Werte. Der *periphere Gefäßwiderstand* W_2 nahm auch beim TA zu Beginn der Inspiration noch ab, um dann sekundär bis kurz nach Exspirationsbeginn beträchtlich anzusteigen. Er fiel aber schon bis zur Mitte der Apnoe wieder auf den Ausgangswert, in verschiedenen Analysen sogar unter diesen (vgl. Gerstenberg u. Mitarb.).

Während der 2. Hälfte der Apnoe blieben die einzelnen Kreislaufgrößen im wesentlichen konstant. Lediglich in einem von 10 Versuchen erschienen hier — ohne jede Atemtätigkeit — rhythmische Schwankungen von Blutdruck und Herzfrequenz, die sich innerhalb des für die normale Atmung geltenden Bereiches hielten (Abb. 2). Die Frequenz dieser Schwankungen entsprach mit rund 20/min etwa der Atemfrequenz vor dem TA. Die Frage muß offen bleiben, ob es sich bei dieser Erscheinung um frequente, atmungsunabhängige Blutdruckwellen dritter Ordnung oder um weiterlaufende vasomotorische Tonusschwankungen im Rhythmus der Atmung handelt.

Diskussion

Der „tiefe Atemzug“ löst nach den vorliegenden Ergebnissen im Vergleich zur normalen Atmung nicht — wie verschiedentlich vermutet — eine qualitativ veränderte, sondern nur eine quantitativ verstärkte Gesamtreaktion des Kreislaufs aus.

Diese Feststellung gilt nicht nur für den spontanen, sondern auch für den durch Pharmaka erzeugten TA des Hundes. Der Angriffspunkt des zum TA führenden Pharmakons scheint für die Art der in Gang gesetzten atmungsabhängigen Kreislaufreaktionen ebenfalls ohne Bedeutung zu sein: Nicotin, Lobelin, KCN, wahrscheinlich auch ATP (vgl. Wagenmann u. Mitarb.) erregen die Atmung über Chemoreceptoren; Histamin und Acetylcholin lösen dagegen gleichartige TA durch vermehrten venösen Rückstrom und stärkere Dehnung des rechten Vorhofs aus (vgl. Schroeder u. Blohmke). Die atmungsabhängigen Kreislaufeffekte waren bei der Injektion von Histamin und Acetylcholin aber durchaus denen nach Nicotin, KCN, Lobelin und ATP ähnlich. Ein Unterschied bestand nur darin, daß bei Histamin und Acetylcholin gleichzeitig mit dem atmungsbedingten Kreislaufgeschehen unter Umständen schwache direkte Kreislaufeffekte dieser Pharmaka auftraten. Dies kam bei Nicotin, KCN, Lobelin und ATP nicht vor.

Beim TA kommen — wie bei normaler Atmung — zur Erklärung der inspiratorischen Beschleunigung und exspiratorischen Verlangsamung der *Herzfrequenz* folgende Mechanismen in Frage: 1. Direkte Koppelung von Atmungs- und Vaguszentrum; 2. reflektorische Koppelung dieser Zentren über die Dehnungsreceptoren der Lunge; 3. Pressoreceptorenreflexe und 4. der Bainbridge-Reflex.

Der Pressoreceptorenreflex scheidet, wie schon Matthes betont hat, als wesentliche Ursache der Frequenzschwankungen beim TA aus. Dies geht aus den zeitlichen Beziehungen zwischen Blutdruck- und Frequenzkurven noch deutlicher hervor als bei normaler Atmung. Die geringe Beteiligung der Pressoreceptoren wird besonders klar an der Beobachtung, daß die Herzfrequenz während der tiefen Inspiration wesentlich

höher ansteigt, obwohl der Blutdruckabfall zu Beginn des TA nicht stärker ausgeprägt ist als bei den vorausgegangenen normalen Atemzügen. Obgleich die unter 1 und 2 aufgeführten Faktoren nicht ausgeschlossen werden können, spricht doch einiges dafür, daß die inspiratorische Tachykardie des TA durch einen Bainbridge-Reflex ausgelöst wird (vgl. Matthes; Gerstenberg u. Mitarb.). Die vermehrte Füllung des rechten Vorhofs wäre dabei als rein atemmechanisch bedingt anzunehmen; sie kann jedenfalls nicht durch inspiratorische Verminderung des peripheren Widerstandes — nach Schroeder u. Brehm die wesentliche Ursache der normalen respiratorischen Arrhythmie — entstehen: Pulsfrequenz und peripherer Widerstand verlaufen beim TA in allen Kreislaufanalysen weitgehend parallel und nicht gegenläufig, wie dies nach der Darstellung von Schroeder für die normale Atmung zu fordern wäre. Man darf in unseren Beobachtungen beim TA daher eine Bestätigung der Ansicht sehen, daß der atemmechanisch ausgelöste Bainbridge-Reflex auch bei normaler Atmung eine, vielleicht die wesentliche Ursache der respiratorischen Arrhythmie sein könnte (vgl. Gerstenberg u. Mitarb.).

Schroeder u. Mitarb. haben beim Menschen und am Hund charakteristische atemsynchrone Veränderungen des peripheren *Gefäßwiderstandes* nachgewiesen und hervorgehoben, daß diese — neben den Variationen des Fördervolumens — an der Entstehung der normalen respiratorischen Blutdruckschwankungen beteiligt sein müssen (vgl. Gerstenberg u. Mitarb.). Dieser Zusammenhang tritt beim TA noch erheblich deutlicher in Erscheinung: Der Blutdruck folgt hier in sämtlichen Versuchen dem Gang des peripheren Gefäßwiderstandes wesentlich enger als dem des Fördervolumens; der kurzen Blutdrucksteigerung entspricht eine ebenso rasch vorübergehende Erhöhung des Widerstands, der langdauernden Blutdrucksenkung ein ähnlicher Widerstandsabfall. Diese Beobachtungen stimmen mit der Annahme von Schroeder überein, daß eine — möglicherweise zentrale — Koppelung der Atemtätigkeit mit der Weite der arteriellen Strombahn besteht. Diese Koppelung wird, wie die Ergebnisse beim TA lehren, bei verstärkter inspiratorischer Innervation besonders augenfällig.

Die Schwankungen des *Fördervolumens* verlaufen beim TA den Variationen des peripheren Widerstands und des Blutdrucks entgegengesetzt. Man muß daher annehmen, daß dem Fördervolumen für das Verhalten des Blutdrucks beim TA nur modifizierende und nicht bestimmende Einflüsse zukommen. So kann vor allem die Blutdrucksenkung während der Apnoe nicht durch eine Abnahme des Fördervolumens erklärt werden: Schlag- und Sekundenvolumen weisen zu diesem Zeitpunkt — verglichen mit den Verhältnissen bei normaler Atmung — eher etwas erhöhte Werte auf.

Fehldeutungen können entstehen, wenn an Stelle des gesamten peripheren Widerstandes die Reaktion einzelner Gefäßgebiete zur Deutung des Blutdruckverhaltens beim TA herangezogen wird. So ist beim TA des Menschen — im Gegensatz zum langdauernden Widerstandsabfall nach vorübergehendem Anstieg in unseren Versuchen — eine über die Apnoe hinaus anhaltende Volumverminderung an Hand, Finger und Zehen, in seltenen Fällen auch am Ohr gefunden und als Anzeichen einer allgemeinen Vasoconstriction aufgefaßt worden (vgl. Goetz; Bolton u. Mitarb.; Mulinos u. Shulman; Gilliatt; Matthes). Die Bahn dieses Reflexes ist ebenso wenig bekannt wie sein Ausbreitungsgebiet am Menschen.

Die Registrierung der Extremitätendurchblutung gestattete uns, neben dem gesamten peripheren Widerstand nach Wezler u. Böger auch noch eine Gefäßprovinz des Hundes getrennt zu beurteilen. Es kam im Anschluß an den TA an der vorderen Extremität aber nur in einzelnen Fällen zu einer Durchblutungsverminderung. Da diese Reaktion beim Hund nur sehr gering und wesentlich kürzer war als die Volumenabnahme an Finger und Zehen beim Menschen, außerdem genau mit dem Blutdruckabfall während der Apnoe zusammenfiel, entstand eher der Eindruck einer druckpassiven Durchblutungsverminderung. In verschiedenen Versuchen blieb die Durchblutung der vorderen Extremität trotz typischer Blutdrucksenkung während der Apnoe sogar konstant, ein Verhalten, das nicht auf eine Gefäßverengerung, sondern im Gegenteil auf eine Gefäßerweiterung hinweist, durch welche die druckpassive Minderdurchblutung offenbar verhindert wird (Abb. 1 A und B).

Diese Diskrepanz zwischen unseren Versuchen am Hund und den zahlreichen Befunden anderer Autoren am Menschen könnte durch Speziesunterschiede bedingt sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß bei der Plethysmographie der Acren am Menschen hauptsächlich die Durchblutung der Haut registriert wird, während an der vorderen Extremität des Hundes die Muskeldurchblutung wesentlich beteiligt ist. Auch danach würde also die viel diskutierte Gefäßreaktion an der Haut der Acren — wie schon aus dem Verhalten des peripheren Widerstands zu schließen — einen Sonderfall darstellen und nicht imstande sein, zur Erklärung des Blutdruckverhaltens beim TA zu dienen.

Zusammenfassung

Mit den Methoden von Schroeder bzw. Wezler u. Böger wurden am wachen Hund die mit dem „tiefen Atemzug“ verknüpften Kreislaufvorgänge im Vergleich zur normalen respiratorischen Arrhythmie und respiratorischen Blutdruckschwankung an Hand von Einzelpulsanalysen näher untersucht. Zur Auslösung der „tiefen Atemzüge“ dienten die Pharmaka Histamin, Acetylcholin, Nicotin, Lobelin, KCN und ATP.

Der „tiefe Atemzug“ löste Kreislaufreaktionen aus, die im wesentlichen eine Verstärkung der atemsynchronen Kreislaufveränderungen bei normaler Atmung darstellen. Die Befunde werden als Stütze bestimmter, früher im einzelnen ausgeführten Ansichten zur Entstehung der normalen respiratorischen Arrhythmie und respiratorischen Blutdruckschwankung angesehen.

Literatur

Bauereisen, E.: Pflügers Arch. **257**, 108 (1953). — Bolton, B., E. A. Carmichael and G. Stürup: J. of Physiol. **86**, 83 (1936). — Gerstenberg, E., U. Wagenmann, E. Schmid u. R. Taugner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol.

229, 520 (1956). — Gilliatt, R. W.: J. of Physiol. **107**, 76 (1948). — Goetz, R. H.: Pflügers Arch. **235**, 271 (1935). — Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart 1951. — Mulinos, M. G., and I. Shulman: Amer. J. Physiol. **125**, 310 (1939). — Schroeder, W.: Z. Biol. **103**, 389 (1950). — Schroeder, W., u. M. Blohmke: Pflügers Arch. **252**, 72 (1949). — Schroeder, W., u. H. Brehm: Pflügers Arch. **255**, 114 (1952). — Schroeder, W., u. H. Losse: Pflügers Arch. **258**, 1 (1953). — Wagenmann, U., E. Schmid u. R. Taugner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 416 (1955). — Wezler, K., u. A. Böger: Ergebn. Physiol. **41**, 292 (1939).

Dr. U. Wagenmann, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, Hauptstr. 47/51

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 119—132 (1957)

Institut für Hygiene und Arbeitsphysiologie der Eidg. Technischen Hochschule Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Grandjean)

Der zeitliche Ablauf einer bedingten Fluchtreaktion bei der Ratte

Von
K. Bättig und E. Grandjean

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. April 1957)

Einleitung

In den letzten fünfzig Jahren sind zahlreiche Methoden zur Erfassung psychischer und psychomotorischer Leistungen von Ratten entwickelt worden, die in den Übersichtsarbeiten von Munn[4], Moss[3] und Warden, Jenkins u. Warner[7] eingehend beschrieben sind. Die meisten der bisher verwendeten Methoden beruhen auf der Messung der Spontanmotilität, der Orientierungsfähigkeit in Labyrinthversuchen, der Unterscheidungsfähigkeit und des Ablaufes bedingter Reflexe.

Bei Mensch und Tier sind die meisten Ermüdungszustände von einer Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit psychomotorischer Funktionen begleitet. Um die Ermüdung auch im Tierversuch der Erforschung zugänglich zu machen, wollten wir ein Verfahren zur Erfassung fördernder oder hemmender Einflüsse auf die Psychomotorik ausarbeiten. Den hier publizierten Untersuchungen lag die besondere Frage zugrunde, ob auf Grund der Pavlovschen bedingten Reflexe die Messung des funktionellen Zustandes des Zentralnervensystems bei der weißen Ratte möglich sei. Wir planten dabei, den zeitlichen Ablauf einer bedingten Fluchtreaktion als Kriterium zu verwenden.

Methode

Versuchsanordnung. Unter den verschiedenen Methoden, die bisher zur Untersuchung bedingter Reaktionen bei der Ratte Verwendung fanden, schien die Konzeption von Warner[8, 9], unseren Zwecken am ehesten dienen zu können. Warner konditionierte in einem durch eine Zwischenwand halbierten Käfig bei Ratten die Flucht vor elektrischen Stromschlägen in das jeweils gegenüberliegende Abteil.

Zum Studium dieser bedingten Fluchtreaktion konstruierten wir folgende Versuchsapparatur:

Ein Holzkäfig von $50 \times 20 \times 15$ cm ist in zwei Abteile unterteilt, wobei die Zwischenwand ein Metalltürchen von 8×8 cm aufweist. Ein Rahmen mit einem Drahtgitter dient als Deckel, so daß das Verhalten des Versuchstiers frei beobachtet

werden kann. Der Käfig, ohne Boden, wird auf einen Metallrost gestellt, der aus parallelen Messingdrähten von 2 mm Durchmesser und 5 mm Abstand besteht. Der Metallrost kann wahlweise unter dem einen oder andern Abteil mit elektrischen Stromschlägen beschickt werden; dem Tier wird so der unbedingte Reiz zur Flucht in die andere Käfighälfte vermittelt. Als elektrische Stromschläge werden Kondensatorentladungen verwendet, die durch eine Thyratronröhre verstärkt werden. Die Verwendung der Thyratronröhre verhindert einen starken Spannungsabfall durch Widerstandsänderungen im Metallrost, die gelegentlich infolge Verschmutzung

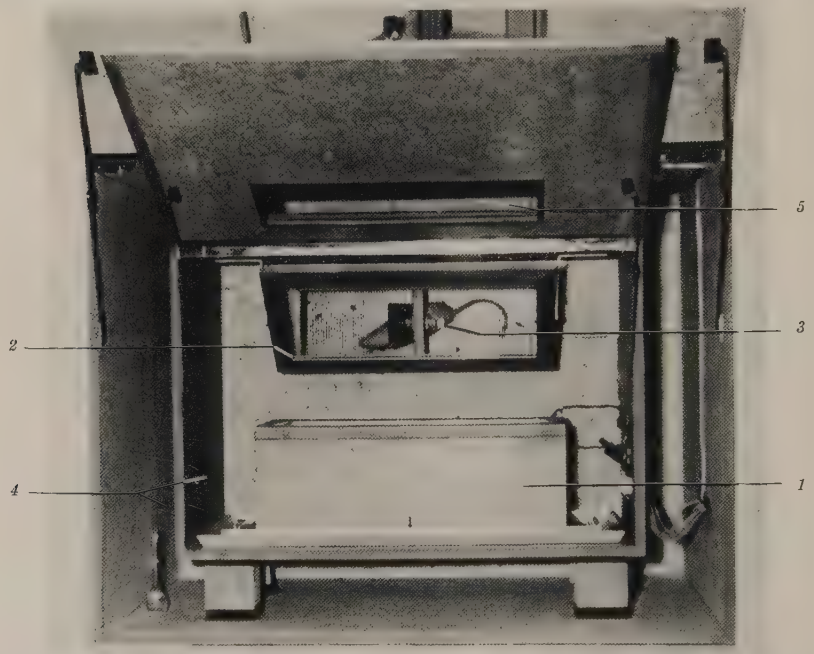


Abb. 1. Übersichtsaufnahme der Versuchsanordnung. *1* Versuchskäfig auf Metallrost. *2* Beobachtungsspiegel. *3* Lämpchen für bedingenden Reiz. *4* Innerer und äußerer Abschirmungskasten. *5* Innerer Kistendeckel mit Beobachtungsfenster

durch Exkremente entstehen können. Die Kondensatorentladungen haben eine Dauer von 2 ms, wobei ihre Reizfrequenz beliebig zwischen 2 und 8 Hz gewählt und ihre Spannung bis auf 250 V gesteigert werden kann. Eine parallel zum Käfigrost geschaltete Indicatorröhre gestattet die ständige Überwachung und Regulierung der Stromschläge.

Als bedingende Reize, die dem Tier vor dem elektrischen Stromschlag präsentiert werden, gelangen Licht oder Ton oder beides zusammen zur Anwendung. Zu diesem Zweck ist in jeder Käfighälfte über dem Durchgang je ein 12 V/3 W-Lämpchen angebracht und hinter dem ganzen Versuchskäfig ein elektrischer Telephonsummer von ebenfalls 12 V. Die beiden bedingenden Signale können zusammen oder einzeln ein- und ausgeschaltet und in ihrer Intensität variiert werden.

Die Sicherstellung konstanter Zeitintervalle zwischen dem Einschalten der bedingenden Licht- und Tonreize und den darauffolgenden Stromschlägen im Rost

übernimmt ein elektronisches Verzögerungsgerät, das die wahlweise Einstellung eines Intervalles von 2,5—32 Hundertstel Minuten gestattet.

Eine Übersicht der Versuchsanordnung läßt sich aus Abb. 1 gewinnen, aus der hervorgeht, daß der eigentliche Versuchskäfig zur Abschirmung der Versuchstiere gegen Einflüsse der Außenwelt in eine doppelte schallisolierende Kammer eingebaut ist. Zwei Fenster und ein Spiegel gestatten die Beobachtung des Tieres von außen. Die Schalldämmung der doppelten Kammer beträgt 26 db.

Die Messung der bedingten Reaktionszeiten. Für diese Arbeit wurden Ratten verwendet, bei denen die bedingte Flucht auf ein optisches Signal hin vorgängig angebahnt worden war. Da wir den zeitlichen Ablauf der bedingten Fluchtreaktionen untersuchen wollten, bedienten wir uns des „instrumental conditioning". Dabei erhält die Ratte die schmerzhaften Stromschläge nur, wenn sie nicht vorher in das andere Käfigabteil flieht. Die Zeit, die der Ratte zu dieser Flucht zur Verfügung stehen soll, war bestimmt durch das Untersuchungsziel, die bedingten Reaktionszeiten zu messen und zu verwerten. In allen Untersuchungen dieser Arbeit erhielten die Ratten die elektrischen Stromschläge 10/100 min nach dem bedingenden Signal. Diese Verzögerung von 1/10 min läßt für die Reaktionszeit einen genügenden Spielraum, um verschiedene die Flucht beschleunigende oder verzögernde Einflüsse untersuchen zu können, und ist anderseits noch genügend kurz, um nicht ein allmähliches Erlöschen der bedingten Fluchtreaktion zu bewirken.

Als „*Reaktionszeit*" stoppen wir mit dem Chronometer die Zeit, die verstreicht vom Moment des Einschaltens des bedingenden Signals bis zu dem Augenblick, in welchem sich die Ratte mit ihrem ganzen Körper (ohne Schwanz) jenseits der Trennwand zwischen den beiden Abteilen befindet.

Für jede Ratte messen wir in einer Versuchssitzung diese Reaktionszeiten in einer ganzen Reihe von Einzelversuchen, um hernach eine durchschnittliche Reaktionszeit zu berechnen.

Auswertung

Häufigkeitsverteilung der Reaktionszeiten. Die zweckmäßigsten Methoden zum Anbahnen der bedingten Reaktionen bildeten den Gegenstand einer eigenen Publikation[1]. Zur Untersuchung der Reaktionszeiten prüften wir zunächst an 8 Ratten mit je 80 Versuchen die Häufigkeitsverteilung der Reaktionszeiten. In dieser Versuchsserie sind folgende Bedingungen eingehalten worden: Verzögerung der Stromschläge auf den bedingenden Reiz (nur Licht) 10/100 min; Pausenintervall zwischen zwei Reaktionen 20/100 min; Zahl der Einzelversuche pro Versuchsserie 20.

Die erhaltenen Resultate sind in Abb. 2 graphisch dargestellt. Wir stellen fest, daß die erhaltene Kurve eine Annäherung an das Bild einer Normalverteilung erkennen läßt. Entsprechend der Versuchsanordnung muß die Kurve am einen Ende, an welchem die Reaktionszeiten gegen

Null streben, die x-Achse erreichen, während sie an ihrem andern Ende abgeschnitten wird, da ja keine bedingte Reaktion von mehr als 10/100 min wegen der automatisch einsetzenden Stromschläge möglich ist. Die Ergebnisse dieser Analyse erlaubten uns in der Folge, die Reaktionszeiten mit Hilfe des *t-Test-Verfahrens* statistisch auszuwerten.

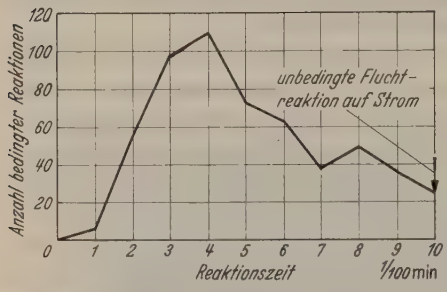


Abb. 2. Häufigkeitsverteilung der Reaktionszeiten

Bewertung der ausfallenden bedingten Fluchtreaktionen. Fällt die bedingte Reaktion auf den bedingenden Reiz (Licht, Ton) aus, so erhält die Ratte nach 10/100 min die schmerzhaften Stromschläge und das Tier reagiert mit der unbedingten Fluchtreaktion. Es erhob sich nun die Frage, wie die in den meisten Versuchsserien gelegentlich auftretenden unbedingten Reaktionen zu berücksichtigen seien.

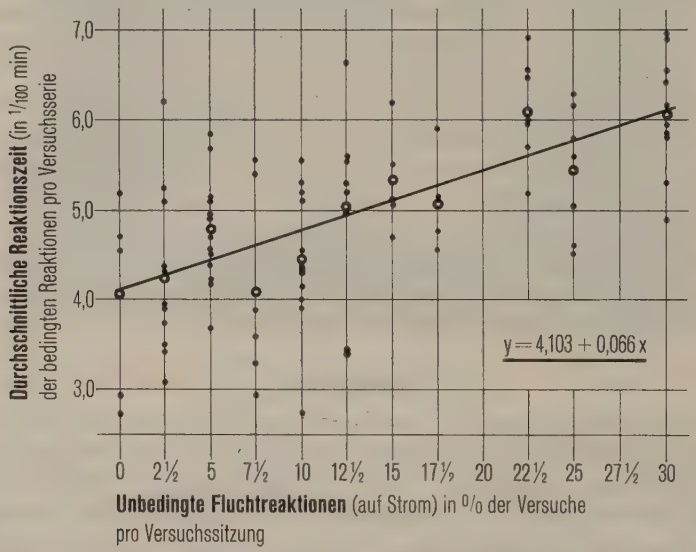


Abb. 3. Korrelation zwischen Verlangsamung und Ausfall bedingter Reaktionen. Die eingekreisten Punkte entsprechen den Durchschnittswerten der Reaktionszeiten für Versuchsserien mit gleicher Anzahl unbedingter Reaktionen

Wir untersuchten vorerst das Verhältnis der Ausfälle bedingter Reaktionen zu den durchschnittlichen Reaktionszeiten pro Versuchssitzung. Bei diesen Versuchen sind folgende Bedingungen eingehalten worden: Verzögerung der Stromschläge 10/100 min; bedingender Reiz Licht; Pausenintervall 20/100 min; Zahl der Einzelversuche 40 pro

Versuchsserie pro Tier. Insgesamt sind 87 Versuchsserien bei 9 Ratten zu je 40 Einzelversuchen durchgeführt worden. Die erhaltenen Resultate sind in Abb. 3 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß *die durchschnittliche Reaktionszeit einer Versuchssitzung um so länger ist je häufiger in dieser Sitzung die bedingte Fluchtreaktion ausfällt.* Mit anderen Worten: Die Ratte muß um so öfter mit dem unbedingten Fluchtreiz der schmerzhaften Stromschläge zur Flucht gezwungen werden, je langsamer die bedingte Fluchtreaktion wird.

Die statistische Analyse der Resultate ergab die in der Abbildung dargestellte Regressionsgerade. Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,605, das Bestimmtheitsmaß B 0,366. Der Korrelationskoeffizient r ist mit $p < 0{,}001$ stark gesichert.

Dieses Ergebnis beweist, daß beide Phänomene einer gleichen physiologischen Gesetzmäßigkeit gehorchen: die nach Pavlov benannte *„innere Hemmung" manifestiert sich* bereits vor dem Erlöschen der bedingten Reaktionen *in einem verlangsamten Ablauf der Reaktion.*

Auf Grund dieser Korrelation haben wir in der Folge auch die auftretenden unbedingten Reaktionen berücksichtigt. Wir haben dementsprechend pro Versuchsserie den Durchschnittswert aus den zeitlichen Abläufen der bedingten und der unbedingten Fluchtreaktionen ermittelt. Da die Korrelation, auf die wir uns stützen, nur gültig ist bis zu einem Anteil von 30% ausgefallener bedingter Fluchtreaktionen, haben wir auch nur diejenigen Versuchsserien berücksichtigt und statistisch verwertet, in welchen nicht mehr als 30% bedingte Reaktionen ausfielen.

Beeinflussung der Reaktionszeiten durch Tageszeit und Tagesfolge. Es wäre denkbar, daß die Tageszeit die bedingte Fluchtreaktion ebenso beeinflussen würde, wie sie bekanntermaßen den Grad der Spontanaktivität beeinflußt. Ebenso denkbar wären Schwankungen der Reaktionszeit von Tag zu Tag. Für spätere Untersuchungen planten wir in erster Linie, diese bedingte Reaktionszeit als Maß der Einwirkung pharmakologischer Stoffe zu verwenden. Um zu sehen, ob solche zeitbedingte Schwankungen in diesen späteren Untersuchungen die Wirkung eines zentralnervös wirksamen Präparates überdecken könnten, wählten wir als Testdroge Coffein zum Vergleich mit der Wirkung von Tagesfolge und Tageszeit. Von Coffein wiesen Skinner u. Heron[6] nach, daß es ab 10 mg/kg die Zahl der Ausfälle bedingter Reaktionen bei der Ratte herabsetzt. Wir verglichen daher die Wirkung von 10 mg/kg Coffein mit dem Einfluß der Tagesfolge und der Tageszeit an Hand der folgenden Versuchsanordnung:

5 Ratten erhielten am ersten Vormittag, 1 Std vor Versuchsbeginn, 10 mg/kg Coffein per os, und 4 weitere Ratten in gleicher Weise Wasser als Placebo. Am Nachmittag wurden die beiden Gruppen vor der Messung der Reaktionszeiten umgekehrt

behandelt. Für den nächsten Tag wurde die Reihenfolge für beide Gruppen nochmals vertauscht. Der ganze Versuch gelangte dann an zwei weiteren Versuchstagen nochmals zur Durchführung. Die Zahl der Einzelversuche pro Ratte und Versuchssitzung betrug 40, das Pausenintervall zwischen diesen Einzelversuchen 30/100 min. Als bedingendes Signal wurde Licht verwendet. Die Reaktionszeiten des 1. und 3. Tages wurden nun jenen des 2. und 4. Tages gegenübergestellt, die Reaktionszeiten aller Vormittage jenen aller Nachmittage und schließlich alle nach Coffein erhaltenen Reaktionszeiten den entsprechenden Placebowerten.

Tabelle 1. *Streuungszerlegung der Reaktionszeiten zwischen Tagesfolge, Tageszeiten und Behandlung*

Durchschnittliche Reaktionszeiten in 1/100 min		Streuung				
		Differenz in 1/100 min	Durchschnittsquadrat zwischen	Durchschnittsquadrat innerhalb (= Rest)	F	p
1. u. 3. Tag	4,903	0,197	0,702	0,911	0,771	$> 0{,}30$
2. u. 4. Tag	5,100					
Vormittage	5,019	0,036	0,024	0,283	0,085	$> 0{,}70$
Nachmittage	4,983					
nach Wasser per os	5,404	0,805	11,656	0,365	31,934	$< 0{,}001$
nach 10 mg/kg Coffein p.o.	4,599					

Tab. 1 gibt, neben den durchschnittlichen Reaktionszeiten und den aus diesen Gegenüberstellungen erhaltenen arithmetischen Differenzen der Durchschnittswerte, die errechnete Streuungszerlegung wieder.

Diese Streuungszerlegung zeigt, daß die durchschnittliche Streuung *innerhalb dieser drei Faktoren* sehr gering ist und 1/100 min nicht übersteigt. Die Streuung *zwischen den einzelnen Versuchstagen* und *zwischen den Tageszeiten* ist im Durchschnitt noch geringer, so daß eine signifikante Wirkung für diese beiden Faktoren nicht nachgewiesen werden kann. Die *zwischen Placebo und Coffein* bestehende durchschnittliche Streuung ist dagegen so groß, daß der Einfluß des Coffeins deutlich signifikant wird.

Aus dieser Streuungszerlegung können wir den Schluß ziehen, daß der Einfluß der Tageszeit und die Streuung von Tag zu Tag für pharmakologische oder ähnliche Versuche vernachlässigt werden können.

Das bedingende Signal

Einfluß der Reizqualität auf die Reaktionszeit. Die Arbeiten Pavlovs[5] ließen erwarten, daß die Stärke des bedingenden Reizes auf die bedingte Reaktion selbst einen entscheidenden Einfluß ausüben würde. Wir

prüften deshalb in einem weiteren Versuch die Frage, ob die Reaktionszeit denselben Gesetzen gehorche wie die von PAVLOV untersuchten bedingten Reflexe.

Die Versuchsbedingungen waren folgende: Verzögerung der Stromschläge 10/100 min; Pausenintervall zwischen den Einzelversuchen 15/100 min; Zahl der Einzelversuche 30 pro Versuchsserie pro Tier. Insgesamt sind 30 Versuchsserien bei 15 Ratten durchgeführt worden. Vorgängig erfolgte die Anbahnung bei allen Tieren mit Lichtsignalen als alleinigem bedingendem Reiz. Für diesen Versuch kam als bedingender Reiz bei einer Versuchsgruppe zuerst Licht + Ton und bei der anderen Versuchsgruppe zuerst Licht allein zur Verwendung. Am nächsten Tag erfuhren die

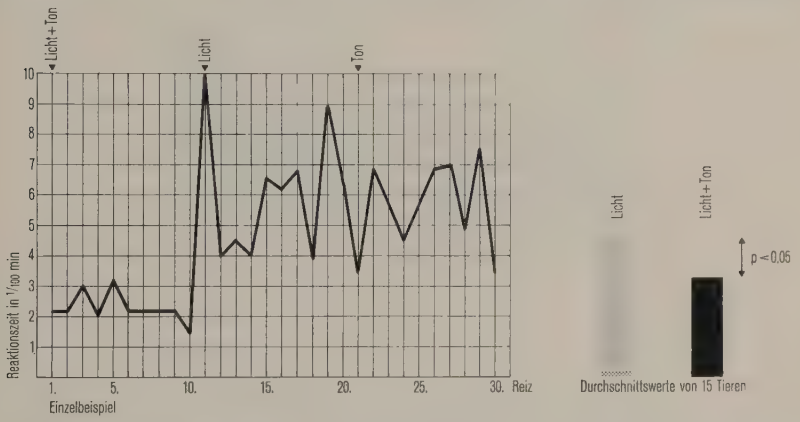


Abb. 4. Einfluß der Qualität des Reizsignals auf die Reaktionszeit

beiden Gruppen die umgekehrte Behandlung. Die Durchschnittswerte der Reaktionszeiten für beide Reizqualitäten sind in der rechten Hälfte der Abb. 4 graphisch dargestellt.

In einer andern Versuchsserie wurden denselben Tieren innerhalb einer Versuchsserie zuerst 10mal Licht + Ton, dann 10mal Licht allein und schließlich 10mal Ton allein als bedingender Reiz präsentiert. Von diesen Versuchen sind die Reaktionszeiten einer einzelnen Ratte in der linken Hälfte der Abb. 4 graphisch dargestellt.

Aus den Ergebnissen dieser beiden Versuche geht hervor, daß die durchschnittliche Reaktionszeit von der Zusammensetzung der bedingenden Reizsignale abhängig ist. Ein zusätzlicher auditiver Reiz zum optischen Lichtsignal verkürzt die durchschnittliche Reaktionszeit, was einer Verstärkung der bedingten Reaktion gleichkommt.

Zu einem analogen Ergebnis kamen wir durch die reine Verstärkung des Lichtsignals oder durch die Erhöhung der Lautstärke des Tons allein. *Die Intensivierung des bedingenden Reizes führte immer zu einer Beschleunigung des Reaktionsablaufes.* Aus diesen Resultaten zogen wir den Schluß, daß Reaktionszeiten nur dann vergleichbar sind, wenn in den entsprechenden Versuchen die bedingenden Reizsignale immer die gleiche Stärke haben. Dabei muß jedes Signal nicht nur absolut gemessen die

gleiche Stärke haben, sondern auch in Beziehung zu der momentanen Beleuchtungsstärke im Versuchskäfig oder zum momentan herrschenden Geräuschpegel.

Verlauf der „inneren Hemmung" gemessen an der Reaktionszeit. Wenn der unbedingte Schmerzreiz zur Flucht dem Tier nicht mehr gegeben wird, so erscheinen die bedingten Reaktionen immer später und bleiben

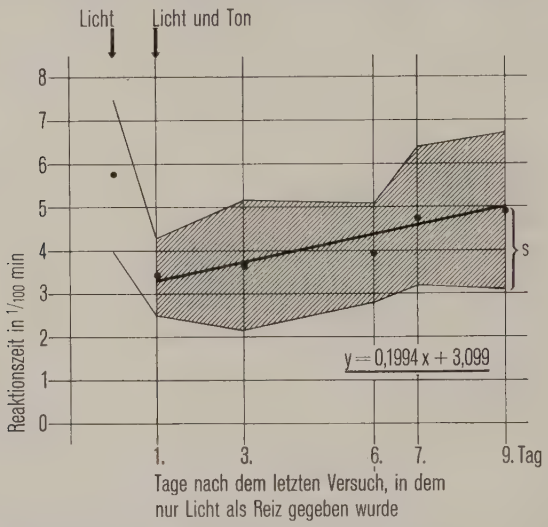


Abb. 5. Die sukzessive Wiederverlangsamung einer durch Verstärkung des bedingenden Signals beschleunigten bedingten Reaktion („innere Hemmung"). Die durch zusätzlichen Tonreiz bewirkte Verkürzung der Reaktionszeit verschwindet allmählich trotz Beibehaltung des verstärkten Reizsignals. Die Kreise entsprechen den Durchschnittswerten der Reaktionszeiten von je 15 Versuchstieren

schließlich ganz aus. Ein äußeres Signal wird also von einem Tier auf das voraussignalisierte Ereignis beantwortet. Dieses Phänomen stellt einen „Vorgang der inneren Hemmung" im Sinne Pavlovs dar.

Da wir in den vorausgegangenen Untersuchungen einen engen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Reaktionszeit und der Anzahl ausfallender bedingter Reaktionen festgestellt hatten, schien es uns von Interesse, den Verlauf der inneren Hemmung mit Hilfe der Reaktionszeit zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde folgender Versuch angestellt:

Bei 15 Ratten, die auf Licht allein konditioniert waren, verstärkten wir dieses optische durch ein zusätzliches Tonsignal und beobachteten an den folgenden Tagen das weitere Verhalten der Reaktionszeit. Im übrigen betrug die Verzögerung der Stromschläge 10/100 min, das Pausenintervall 20/100 min und die Zahl der Einzelversuche 10 pro Versuchsserie und pro Tier.

Aus den in Abb. 5 dargestellten Resultaten geht hervor, daß die Verstärkung des bedingenden Reizes durch Ton eine deutliche Verkürzung der Reaktionszeit bewirkt hat. In der Folge verlängerten sich diese

Reaktionszeiten allmählich, um gegen Ende der 10tägigen Versuchsperiode dem Ausgangswert, der durch Licht allein erzielt worden war, zuzustreben. Der Anstieg der Reaktionszeit über die ganze Versuchsperiode ist stark gesichert da $p < 0{,}001$ für den Korrelationskoeffizienten $r = 0{,}376$.

Aus diesen Versuchen geht somit hervor, daß die Verstärkung des Reizsignals zu einer Verkürzung der Reaktionszeit führt, daß sich aber diese Veränderung in den folgenden Tagen sukzessive zurückbildet. Man

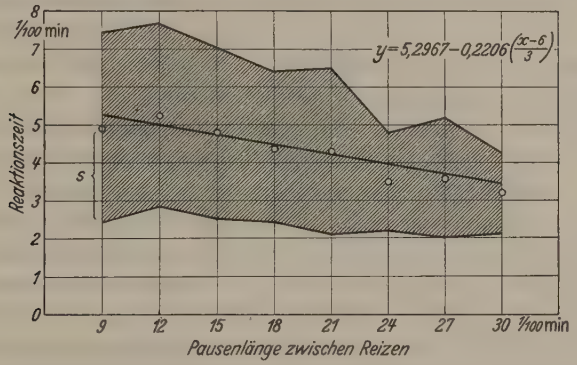


Abb. 6. Einfluß der Pausenzeit auf die durchschnittliche Reaktionszeit

kann somit an Hand der Reaktionszeit die allmählich auftretende Schwächung einer bedingten Reaktion, das heißt *den zeitlichen Ablauf der inneren Hemmung, verfolgen.*

Einfluß des Zeitintervalles zwischen zwei Reizsignalen (Pausenzeit) auf die Reaktionszeit. Pavlov[5] hat beobachtet, daß ein bedingter Reflex rascher ermüdet, daß also der Prozeß der „inneren Hemmung" schneller voranschreitet, wenn die zwischengeschalteten Pausenzeiten verkürzt werden. Lorenz[2] hat die gleiche Erfahrung bei der Beobachtung von Instinkthandlungen gemacht. Er erklärte das Phänomen damit, daß in den Pausenzeiten eine gewisse „reaktionsspezifische Energie" aufgestapelt wird, die das Tier beim Vollführen der Instinkthandlung aufbraucht. Dabei wäre die Größe dieser „reaktionsspezifischen Energie" von der Pausenzeit, die zu ihrer Kumulation zur Verfügung steht, abhängig.

Aus naheliegenden Gründen erhob sich nun für uns die Frage, ob die Dauer der Pausenzeit ebenfalls einen Einfluß auf die Reaktionszeit entfalten könne. Die diesem Zweck dienenden Versuche sind unter folgenden Bedingungen durchgeführt worden: Verzögerung der Stromschläge 10/100 min; Zahl der Einzelversuche 40 pro Versuchsserie und pro Ratte. Insgesamt sind 569 Einzelversuche, auf 5 Tiere verteilt, durchgeführt

worden. Die Pausenzeiten wurden in unregelmäßiger Folge dauernd innerhalb eines Zeitraumes von 9/100 bis 30/100 min gewechselt. Als bedingende Reize fanden nur Lichtsignale Verwendung.

Aus den in Abb. 6 dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß *die durchschnittlichen Reaktionszeiten um so kürzer werden, je länger die Pausenzeiten werden.* Die Verlängerung der Pausenzeit von 9/100 auf 30/100 min verkürzt im Durchschnitt die Reaktionszeit um nahezu 2/100 min. Der berechnete Korrelationskoeffizient r beträgt 0,177; er ist mit einem $p < 0{,}001$ stark gesichert. Die in der Abbildung eingetragene Regression hat einen statistisch ebenfalls stark gesicherten Steigungskoeffizienten. Für uns ergab sich daraus die praktische Folgerung, daß für vergleichende Untersuchungen der Reaktionszeiten die Pausenzeiten immer streng konstant gehalten werden müssen.

Die Beibehaltung gleicher Pausenintervalle brachte gelegentlich eine Komplikation mit sich: bei einzelnen Tieren entstanden neue bedingte Reaktionen, bei denen die Zeit, das heißt die zu Ende gehende Pausenzeit, das bedingende Signal darstellte. Dies zeigte sich darin, daß die Ratten begannen, schon vor dem optischen Signal in den andern Käfig zu fliehen. Die Flucht vollzog sich dabei in einem Rhythmus, der nahezu dem Pausenintervall entsprach. Wir konnten die von Pavlov gemachten Beobachtungen über diese „bedingten Reflexe zweiter Ordnung" bestätigen und fanden, daß sie sich leicht zurückbildeten. Es genügte jeweilen, eine solche Ratte so lange ohne Lichtsignale und Stromschläge im Versuchskäfig zu belassen, bis sie nicht mehr spontan in einem festen Rhythmus hin und her ging, also bis die bedingte Reaktion auf Zeit infolge der „inneren Hemmung" verschwunden war.

Der unbedingte Fluchtreiz (schmerzhafte Stromschläge)

Einfluß des Zeitintervalles zwischen bedingendem Reizsignal und Stromschlägen auf die Reaktionszeit. Um den Ausfall bedingter Fluchtreaktionen (auf Stromschläge) pro Versuchsserie zu reduzieren, versuchten wir, durch Vorschaltung von einigen Leerversuchen die bedingte Reaktion aufzufrischen und zu festigen. Zu diesem Zweck verkürzten wir in diesen Vorversuchen die Verzögerungszeit zwischen Reizsignal und Stromschlag. Wir stellten uns dabei die Frage, welchen Einfluß die Verzögerungszeiten der Vorversuche auf die Reaktionszeiten der nachfolgenden eigentlichen Meßversuche ausüben würden.

Zur Prüfung dieser Frage wählten wir folgende Versuchsbedingungen: Verzögerung der Stromschläge im eigentlichen Meßversuch 10/100 min; Zahl der Einzelversuche 10 pro Versuchsserie und pro Tier. Insgesamt sind 210 Einzelversuche (exkl. Vorversuche) bei 7 Tieren in 21 Versuchsserien durchgeführt worden. Jeder dieser Versuchsserien schickten wir 10 Vorversuche voraus. In diesen Vorversuchen haben wir die Zeitspanne zwischen bedingendem Reizsignal und unbedingter Fluchtreaktion in je 7 Versuchsserien auf 2/100, 3/100, resp. 6/100 min festgelegt.

Die in Abb. 7 graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen, daß *die im eigentlichen Meßversuch festgestellten Reaktionszeiten um so kürzer ausfielen, je kürzer die Verzögerungszeiten in den Vorversuchen waren.* Wir haben es somit in der Hand, durch Änderungen der Verzögerungszeit in den Vorversuchen die nachfolgend gemessenen durchschnittlichen Reaktionszeiten zu beeinflussen, sogar nach Wunsch zu verlängern oder zu verkürzen.

Auf Grund der in diesem Versuch gewonnenen Erkenntnisse haben wir in der Folge jedem Meßversuch, je nach dem Ziel der Untersuchungen, 2—5 solche Vorversuche mit verkürzter Verzögerungszeit von 2,5 bis 4/100 min vorausgeschickt. Wir nennen sie im folgenden kurz „Verstärkungs-Vorversuche".

Einfluß der Qualität der Stromschläge auf die Reaktionszeit. In einer weiteren Reihe von Versuchen haben wir den Einfluß der Stärke und der Frequenz der Stromschläge auf die Reaktionszeiten untersucht.

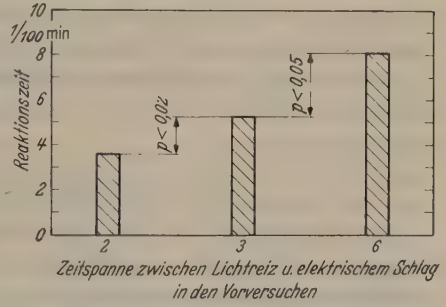


Abb. 7. Einfluß von „Verstärkungsvorversuchen" mit verkürztem Intervall zwischen bedingendem Signal und Stromschlägen auf die durchschnittliche Reaktionszeit der nachfolgenden Meßversuche

Zu diesem Zweck verglichen wir, bei gekreuzter Versuchsanordnung, einmal die Reaktionszeiten bei Stromschlägen von 120 V mit denjenigen bei 180 V, und ein anderes Mal bei Stromschlägen von 120 V und 240 V. Die übrigen Versuchsbedingungen waren folgende: Verzögerung 10/100 min; Pausenintervall 15/100 min; Zahl der Einzelversuche 10 pro Versuchsserie und pro Tier; Zahl der Verstärkungs-Vorversuche 3 mit Verzögerung von 3/100 min. Insgesamt sind bei 14 Tieren 56 Versuchsserien durchgeführt worden.

Die Versuche mit Stromschlägen von 180 V und 240 V haben gegenüber 120 V eine Verkürzung der Reaktionszeiten von ungefähr 10% ergeben. Diese Verkürzung konnte aber in keinem der beiden Fälle statistisch gesichert werden. Bei diesen Versuchen konnten wir beobachten, daß einzelne Ratten nach den stärkeren Schlägen rascher flohen, daß aber andere Tiere gelegentlich auf die stärkeren Schläge mit einem pathologischen Verhalten reagierten, das der im Schrifttum beschriebenen „experimentellen Neurose" sehr ähnlich war. Diese Tiere zeigten nach den ersten verstärkten Stromschlägen ein stuporähnliches Verhalten. Aus diesem Grund wiesen die gemessenen Reaktionszeiten bei hohen Stromschlägen größere Streuungen auf, so daß die beobachtete 10%ige Verkürzung statistisch nicht gesichert werden konnte.

Mit einer analogen Versuchsanordnung haben wir den Einfluß der Frequenzen 2,5 Hz und 8 Hz der Stromschläge auf die durchschnittlichen

Reaktionszeiten untersucht. Die Resultate ergaben, daß die beiden geprüften Frequenzen im Durchschnitt dieselben Reaktionszeiten bewirkten. Es zeigte sich auch hier, daß die Veränderung der gewohnten Frequenz von 2,5 auf 8 Hz eine Vergrößerung der Streuung der einzelnen Reaktionszeiten auslöste, wobei ebenfalls gelegentlich ein pathologisches Verhalten beobachtet werden konnte.

Vergleichen wir diese Ergebnisse mit den oben beschriebenen Wirkungen der Verzögerungszeit, so müssen wir feststellen, daß in erster Linie die Verzögerung, mit welcher die Stromschläge auf das Lichtsignal gegeben werden, die Reaktionszeiten entscheidend beeinflußt. Es ist somit für den Reaktionsablauf nicht wichtig, wie und wie stark der unbedingte Reiz (Stromschlag) ist, sondern *mit welcher Verzögerung* er nach dem bedingenden Lichtsignal auftritt.

Auf Grund dieser Versuche haben wir in der Folge immer eine Spannung von 120—140 V und eine Frequenz von 2,5 Hz für die Stromschläge angewendet.

Unser standardisiertes Meßverfahren

Die Ergebnisse der vorliegenden methodischen Untersuchungen zwingen zur Forderung, die Wirkung irgend eines von außen gesetzten Einflusses auf die bedingte Reaktion nur an Hand von streng einheitlich gewonnenen Reaktionszeiten zu beurteilen. Daraus resultiert der Vorschlag zur Verwendung des nachfolgend skizzierten, nur noch einen schmalen Spielraum gewährenden Standardversuchsprogramms:

Als Versuchstiere kommen nur Ratten in Frage, bei denen die bedingte Fluchtreaktion in nicht mehr als 30% der Einzelversuche von 3 aufeinanderfolgenden Sitzungen ausfällt. Da die individuelle Schwankung zwischen den Reaktionszeiten gering ist, genügt die Verwendung von 8 Tieren pro Gruppe.

Die Testfolge zur Erfassung eines Einflusses auf die bedingte Reaktion wird gekreuzt. Die erste Hälfte der verwendeten Rattengruppe wird am ersten Versuchstag unter dem fraglichen Einfluß getestet, während die zweite Gruppe die Kontrollwerte liefert. Für den zweiten Versuchstag wird dieses Verfahren den beiden Halbgruppen umgekehrt zugeteilt. So liefert jede Ratte je eine Kontroll- und eine Testreaktionszeit, und die Einflüsse der Testfolge heben sich so auf.

Der bedingende Fluchtreiz besteht aus dem kombinierten Licht-Ton-Signal. Seine Intensität und Zusammensetzung muß innerhalb eines Versuchs streng konstant gehalten werden, da Veränderungen des Signals die Reaktionszeit beeinflussen.

Der unbedingte Fluchtreiz muß für jede Ratte deutlich fühlbar, aber nicht extrem schmerzhaft sein. Diese Bedingung erfüllen Kondensatorentladungen von 2 msec Dauer, einer Frequenz von 2,5 Hz und einer

Spannung von 120 V. Sie dürfen innerhalb eines Versuchs in ihrer Qualität nicht verändert werden.

Die Verzögerung der elektrischen Stromschläge auf das bedingende Signal, die den Ratten ermöglicht, in das andere Käfigabteil zu fliehen, bevor sie mit dem Schmerz zu dieser Flucht gezwungen werden, beträgt einheitlich 10/100 min.

Die „Verstärkungsvorversuche" mit dem verkürzten Intervall zwischen dem bedingenden Signal und den schmerzhaften Stromschlägen zu Beginn einer Versuchssitzung frischen die bedingte Reaktion auf und beschleunigen sie. Das Signal-Stromschlag-Intervall wird in diesen Vorversuchen auf 5, 4, 3 oder 2,5/100 min herabgesetzt. Die Zahl dieser Vorversuche, in denen im übrigen die bedingte Reaktionszeit nicht gemessen wird, beträgt 3—5.

Die Zahl der Versuche pro Einzelratte und Sitzung zur Ermittlung einer durchschnittlichen bedingten Reaktionszeit beträgt 10—30. Diese Zahl kann verschieden hoch angesetzt werden; sie soll aber innerhalb eines ganzen Versuchs gleich bleiben.

Das Pausenintervall zwischen den einzelnen Versuchen einer Sitzung kann bis auf 15/100 min verkürzt werden. Es muß unbedingt innerhalb eines Versuchs für alle Ratten konstant gehalten werden.

Die durchschnittliche bedingte Reaktionszeit pro Ratte wird ermittelt aus den zeitlichen Abläufen der bedingten und der unbedingten Fluchtreaktionen einer Sitzung.

Die unbedingten Fluchtreaktionen werden also als stark verlangsamte bedingte Fluchtreaktionen aufgefaßt, die nicht abgewartet, sondern 10/100 min nach dem bedingenden Signal durch den unbedingten Fluchtreiz erzwungen wurden. Dieses Verfahren gelangt aber nur für Versuchssitzungen zur Anwendung, in denen nicht mehr als 30% der Fluchtreaktionen auf diese Weise herbeigeführt wurden.

Zur statistischen Auswertung werden die durchschnittlichen Reaktionszeiten der Kontrollversuche den Messungen der entsprechenden Testversuche gegenübergestellt. Die so ermittelte arithmetische Differenz wird an Hand des t-Testes auf ihre Signifikanz geprüft. Bedingt die Untersuchung bei einer Ratte im Testversuch den Ausfall von über 30% bedingter Fluchtreaktionen, so kann dieses statistische Verfahren nicht mehr angewendet werden. In solchen Fällen wird nur die Häufigkeit des Ausfalls bedingter Reaktionen im Kontrollversuch mit dem analogen Phänomen im Testversuch auf Grund des χ^2-Testes verglichen.

Summary

A psychophysiological method was developed to measure stimulating or inhibiting influences on the central nervous system of the rat. For that purpose, the lapse of time of a conditioned escape response was studied under various experimental conditions.

The rats were conditioned to escape from one into the other part of a cage. An optical and acoustical signal was used as conditioning stimulus. 10/100 min later the unconditioned stimulus was given by mean of electrical shocks through a floor grid. As reaction time we measured the lapse between the appearing of the conditioning signal and the completed escape of the rat into the safe compartment of the cage.

The investigations on this reaction time gave the following results:

1. The reaction time is shortened with the increase of the intensity of the conditioning signal.

2. Such a produced shortening of the reaction time comes back to normal values spontaneously and successively the next days.

3. The reaction time is shortened by the prolongation of the time space between two conditioned reactions.

4. The reaction time is shortened by preliminary "reinforcement experiences" with short time spaces between conditioning signals and electrical shocks.

5. The reaction time is not modified by the quality nor by the frequency of the electrical shocks.

These results show that the measured reaction time follows the same physiological laws as those described by Pavlov on the conditioned salivary reflexes. On the base of the obtained results an experimental method for measuring the reaction time was standardized; it can be used for testing pharmacological and physiological actions on the central nervous system of the rat.

Literatur

[1] Bättig, K.: Die Anbahnung einer bedingten Fluchtreaktion bei der Ratte. Helvet. physiol. Acta **15** (1957). — [2] Lorenz, K.: Über die angeborenen Formen möglicher Erfahrung. Z. Tierpsychol. **5** (1942). — [3] Moss, F. A.: Comparative psychology. New York: Prentice-Hall 1942. — [4] Munn, N. L.: Handbook of psychological research on the rat. Boston: Houghton Mifflin 1950. — [5] Pavlov, J. P.: Sämtliche Werke. Berlin: Akademie-Verlag 1953. — [6] Skinner, B. F., and W. T. Heron: Effects of caffeine and benzedrine upon conditioning and extinction. Psychol. Rec. **1**, 340—346 (1937). — [7] Warden, C. J., T. N. Jenkins and L. H. Warner: Comparative psychology. A comprehensive treatise. I. Principles and methods. New York: Ronald 1935. — [8] Warner, L. H.: The association span of the white rat. J. Gen. Psychol. **41**, 57—90 (1932). — [9] Warner, L. H.: An experimental search for the "conditioned response". J. Gen. Psychol. **41**, 91—115 (1932).

Dir. Professor Dr. med. E. Grandjean, Eidgenössische Technische Hochschule, Institut f. Hygiene u. Arbeitsphysiologie, Zürich/Schweiz, Clausiusstr. 25

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 133—140 (1957)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. F. Jung)

Die Wirkung von Phenylalkylaminen auf die Sensibilität von acetylcholinempfindlichen Receptoren peripherer Gefäßgebiete

Von
H. Matthies

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Februar 1957)

In Untersuchungen über die Eigenschaften der Chemoreceptoren in den Gefäßgebieten verschiedener Organe der Katze konnten wir feststellen, daß Arterenol und Adrenalin eine Sensibilisierung der acetylcholinempfindlichen Receptoren hervorrufen können (Matthies, Wiegershausen, Otto u. Scholz). Auf Grund von Vergleichen mit den Ergebnissen anderer Autoren bei Experimenten an vegetativen Ganglien (Bülbring, Kewitz u. Reinert, Konzett) wurden wir angeregt, auch die Wirkung anderer Phenylalkylamine auf die von uns untersuchten Chemoreceptoren zu überprüfen.

Methodik

Die Versuche wurden an 90 Katzen in Urethannarkose durchgeführt. Wir isolierten bei den Tieren unter weitestgehender Schonung der Nervenstämme eine Hinterextremität vollständig vom Hauptkreislauf und durchströmten das Bein mit Tyrodelösung von 37° C mit einem Druck von 150 cm Wasser. Die Injektion des als Reiz dienenden Acetylcholins (Ach.) und der zu untersuchenden Phenylalkylamine erfolgte in die arterielle Kanüle des perfundierten Systems. Die reflektorischen Reaktionen des intakten Kreislaufs wurden durch Blutdruckmessung an der Arteria carotis registriert. Weitere Einzelheiten der Methodik sind der oben zitierten Arbeit zu entnehmen.

Ergebnisse

Die Sensibilisierung der Ach.-empfindlichen Receptoren in den peripheren Gefäßgebieten der Katze durch vorherige Injektionen von Arterenol oder Adrenalin in das isolierte System konnten auch in der neuen Versuchsreihe vollauf bestätigt werden. Beide Substanzen führten eine solche Veränderung des Funktionszustandes der Receptoren herbei, daß nach 3—6maliger Injektion von jeweils 200 γ Arterenol oder Adrenalin mit 1—10 γ Ach. die gleichen reflektorischen Reaktionen am intakten Kreislauf hervorgerufen werden konnten wie mit 100 γ Ach. vor der

Injektion der Adrenalinkörper. In einzelnen Versuchen war die Sensibilisierung nicht so ausgeprägt, dann konnte aber zumindest bei Anwendung gleicher Ach.-Dosen nach den Adrenalininjektionen ein deutlich verstärkter Blutdruckeffekt auf Gabe von Ach. in das isolierte System erzielt werden. Bei einigen Tieren trat der Ach.-Effekt überhaupt erst nach Sensibilisierung durch Adrenalin auf.

Tabelle 1

Chemische Struktur und Wirkung auf den Ach.-Effekt von 16 Phenylalkylaminen. + Sensibilisierung; — Hemmung; ∅ ohne Wirkung. Die Wasserstoffatome in den Strukturformeln wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet

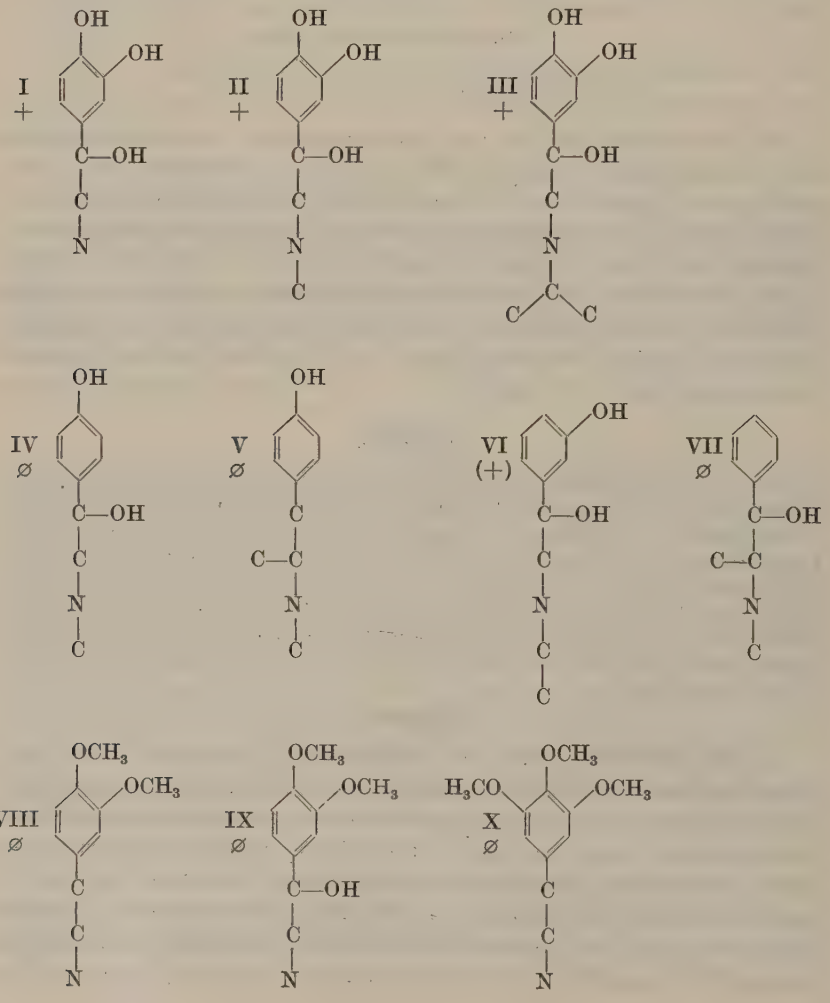
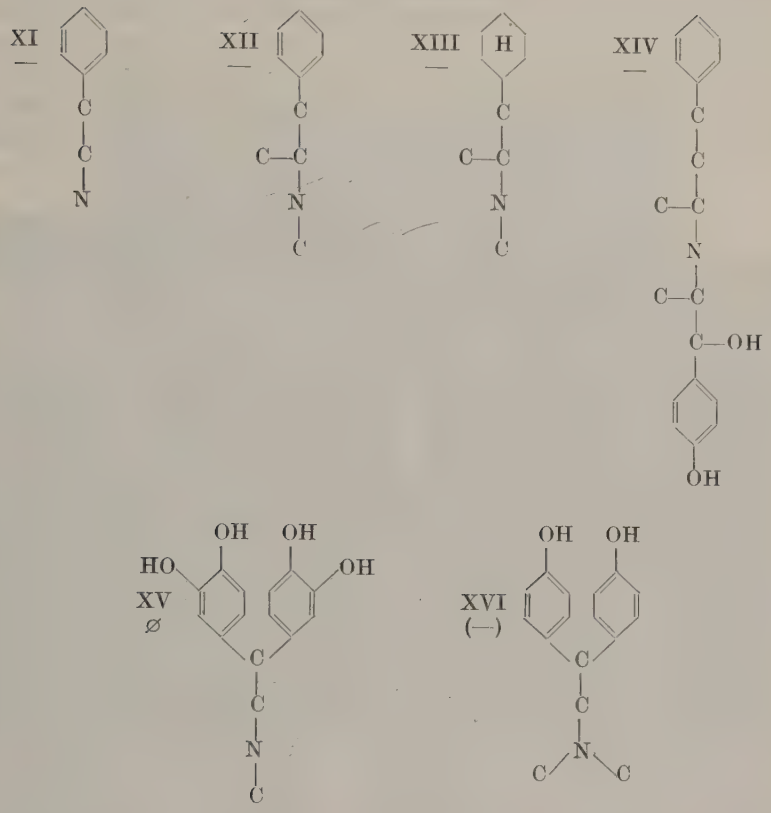


Tabelle 1 (Fortsetzung)



Der Übereinstimmung der Wirkung von Arterenol und Adrenalin auf die Ach.-empfindlichen Receptoren entspricht eine Ähnlichkeit der chemischen Konstitution, soweit es die Brenzcatechinkonfiguration und die alkoholische OH-Gruppe in der Seitenkette betrifft. Um festzustellen, ob diese Konstitutionsmerkmale tatsächlich von Bedeutung für das Zustandekommen der sensibilisierenden Wirkung sind, wurden die gleichen Versuche auch mit Isopropylarterenol, Tab. 1, III (Novodrin, VEB Chemische Fabrik Grünau) durchgeführt. Wie Abb. 1 zeigt, sensibilisiert auch diese Substanz, wenn auch nicht ganz so stark wie Arterenol und Adrenalin.

Daß die oben erwähnten Konstitutionsmerkmale von Bedeutung für den sensibilisierenden Effekt sind, ging auch aus der Untersuchung einer Reihe anderer Phenylalkylamine hervor, die sich vom Arterenol dadurch unterscheiden, daß sie nicht über alle drei OH-Gruppen der Stammsubstanz verfügen. 1-(4-Oxyphenyl)-2-methylamino-äthanol-(1), Tab. 1, IV

(Pentedrin, VEB Chemische Fabrik Grünau); 1-(4-Oxyphenyl)-2-methylaminopropan, Tab. 1, V (Pholedrin, Isis-Chemie GmbH, Zwickau); 1-(3-Oxyphenyl)-2-äthylamino-äthanol-(1), Tab. 1, VI (Effortil, C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim a. Rh.) und 1-Phenyl-2-methylamino-propanol-(1), Tab. 1, VII (Ephedrin, VEB Fahlberg-List, Magdeburg) waren ohne eine deutliche und reproduzierbare Wirkung auf die Ach.-Reizung der Receptoren. Abb. 2 zeigt am Beispiel des Ephedrins das Verhalten

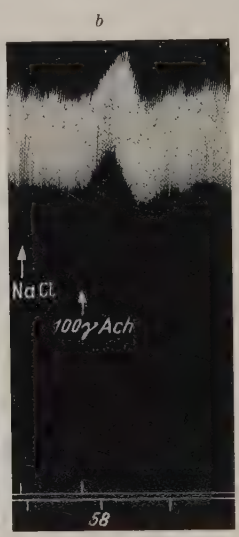


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. Versuch 22: Novodrin. *a*) 100 γ Ach. *b*) 0,5 ml 0,9% NaCl bzw. 100 γ Ach. nach der dritten Novodrininjektion von 200 γ

Abb. 2. Versuch 25: Ephedrin. Blutdrucksteigerung durch 100 γ Ach. vor und nach der dritten Ephedrininjektion von jeweils 200 γ

dieser Substanzen: Nach der 3. Injektion von 200 γ Ephedrin in das isolierte System zeigt sich der Ach.-Effekt unverändert.

Eine 3. Gruppe von Phenylalkylaminen, die wir bei unseren Untersuchungen verwandten, zeichnete sich dadurch aus, daß die ihr angehörenden Substanzen weder phenolische noch alkoholische OH-Gruppen besitzen. Als Vertreter dieser Gruppe untersuchten wir Phenyläthylamin, Tab. 1, XI (E. Merck AG., Darmstadt); 1-Phenyl-2-methylaminopropan, Tab. 1, XII (Pervitin, VEB Pharm. Werk Johannisthal) sowie eine Verbindung mit hydriertem Ring, 1-Cyclohexyl-2-methylaminopropan, Tab. 1, XIII (E 111, VEB Fahlberg-List, Magdeburg). Überraschenderweise erhielten wir im Anschluß an eine Injektion von 200—1000 γ dieser Derivate in den isolierten Gefäßabschnitt eine teilweise oder völlige Hemmung des Ach.-Effektes. Am Beispiel der Wirkung

von E 111 mögen die Befunde illustriert werden. Eine einmalige Injektion von 200 γ E 111 in das isolierte System zeigt eine Abschwächung der durch 100 γ Ach. hervorgerufenen reflektorischen Blutdruckreaktion

Abb. 3. Versuch 79: E 111. Aufhebung des Ach.-Effekts auf 100 γ Ach. durch 1 mg E 111

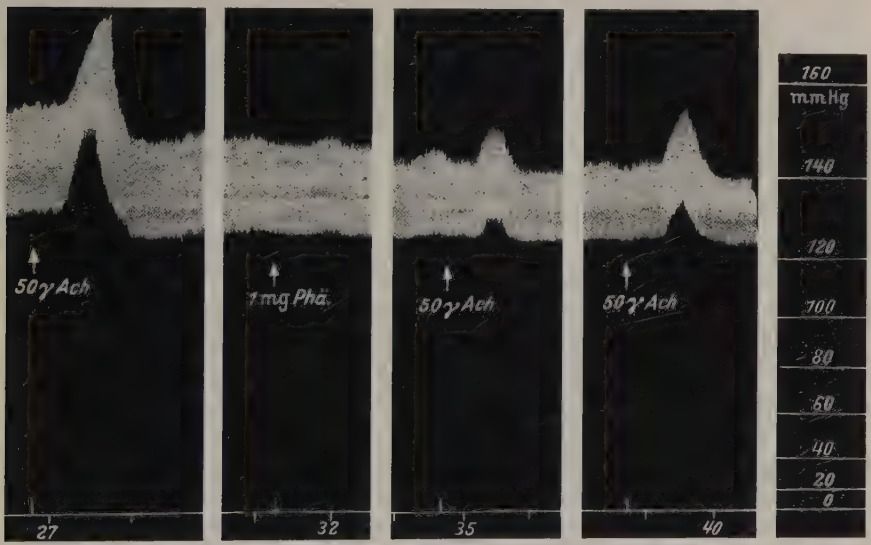


Abb. 4. Versuch 65: Phenyläthylamin. Vorübergehende Abschwächung des Ach.-Effekts auf 50 γ Ach. durch 1 mg Phenyläthylamin

am intakten Kreislauf. Die hemmende Wirkung ist oft sehr anhaltend und dauerte häufig bis zum Abbruch des Versuchs. Wurden höhere Dosen von E 111 gegeben, so konnte es zu einer vollständigen Blockierung des Ach.-Effektes kommen (Abb. 3). Auch wesentlich höhere Dosen Ach. als sie zu Anfang des Versuches zur Erzielung des Ach.-Effektes notwendig waren, riefen dann keine Blutdrucksteigerung mehr hervor. Wie E 111 wirkte auch Pervitin, die Wirkung von Phenyläthylamin hingegen war schwächer und von geringerer Dauer (Abb. 4).

Eine besondere Stellung im Hinblick auf die chemische Konstitution nimmt das 1-(4-Oxyphenyl)-2-(1′-methyl-3′-phenylpropyl-amino)-propanol-(1), Tab. 1, XIV (Dilatol, Troponwerke Dinklage & Co., Köln-Mülheim) ein, da es sowohl im Hinblick auf die hier vorgenommene Einteilung als Derivat des Phenylbutylamins, als auch des Oxyphenylaminopropanols angesehen werden kann. Wie unsere Versuche ergaben, hemmt es den Ach.-Effekt, so daß es aus diesem Grunde in die Pervitin-Gruppe eingereiht werden könnte.

Die Substitution der phenolischen OH-Gruppen des Arterenols durch Methoxy-Gruppen führt zu einer Aufhebung der sensibilisierenden Wirkung, 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-aminoäthanol-(1), Tab. 1, IX (VEB Chemische Fabrik, Grünau) beeinflußt den Ach.-Effekt nicht. Auch 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-aminoäthan, Tab. 1, VIII (VEB Chemische Fabrik, Grünau) und 1-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-aminoäthan, Tab. 1, X (Meskalin) sind ohne Wirkung. Es kommt aber auch nicht durch vollständigen Verlust der OH-Gruppen bei teilweisem Ersatz durch Methoxy-Gruppen zu einer hemmenden Wirkung.

Schließlich wurde von uns auch noch 1-Bis-(3,4-Dioxyphenyl)-2-methylamino-äthan untersucht, es ergab sich bei dieser Verbindung Wirkungslosigkeit (Tab. 1, XV; VEB Chemische Fabrik, Grünau). Im Gegensatz dazu rief 1-Bis-(4-Oxyphenyl)-2-dimethylaminoäthan, Tab. 1, XVI (VEB Chemische Fabrik, Grünau) bei Injektion von 200 γ in das isolierte System eine schnell vorübergehende Hemmung hervor.

Diskussion

Wenn man die in der Tab. 1 zusammengefaßten Ergebnisse noch einmal überblickt, so fällt auf, daß zwischen der chemischen Struktur der untersuchten Phenylalkylamine und ihrer Wirkung auf die Ach.-empfindlichen Receptoren der peripheren Gefäße der Katze (gleichartige Befunde ließen sich auch bei Versuchen an der Ratte erheben, worüber später berichtet werden soll) bestimmte Beziehungen herzustellen sind. Offenbar ist für die sensibilisierende Wirkung an den Receptoren die 3,4-Oxyphenyl-Konfiguration in Verbindung mit einer alkoholischen OH-Gruppe an dem C-1-Atom der Phenylalkylamine verantwortlich zu machen, während die ausgeprägte Hemmung durch die Substanzen zustande kommt, welche über keinerlei OH-Gruppen verfügen. Inwieweit die Übergangsformen zwischen diesen beiden Extremen mehr den einen Effekt oder den anderen hervorrufen, wenn auch in sehr schwacher Form, ließ sich mit der von uns angewandten Methode noch nicht feststellen. Um diese Frage zu beantworten, müßten empfindlichere Registrierungen benutzt werden, beispielsweise Aktionsstrommessungen der zentripetalen Nervenfasern der Receptoren. Auf jeden Fall sind die Befunde für die beiden extremen Gruppen eindeutig und

gut reproduzierbar und ermöglichen gewisse Schlußfolgerungen. Unsere ersten Untersuchungen an den Receptoren der peripheren Strombahn, über die wir bereits berichteten, ließen uns zu der Annahme kommen, daß im untersuchten Receptorenfeld mit synaptischen Strukturen zu rechnen ist. Wir kamen zu dieser Vermutung auf Grund der Analogie unserer Befunde mit den Ergebnissen, die bei pharmakologischer Untersuchung der ganglionären Synapsen erhalten werden können (Bülbring, Kewitz u. Reinert, Konzett). Inzwischen konnte auch an der myoneuralen Synapse der quergestreiften Muskulatur weitgehend übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Montagu konnte in Untersuchungen am innervierten isolierten Rattenzwerchfell zeigen, daß die durch KCl hervorgerufene Depression der indirekten elektrischen Stimulation des Zwerchfells durch die gleichen Phenylalkylamine aufgehoben werden kann, welche in unsere Versuchsanordnung eine Sensibilisierung der Receptoren für Ach. hervorrufen, wie z. B. Adrenalin und Arterenol. Im Gegensatz dazu kam es durch Pervitin und Benzedrin zu einer Verstärkung der durch KCl hervorgerufenen Hemmung der Erregungsübertragung an der myoneuralen Synapse, was mit der von uns gefundenen Hemmung der Ach.-Reizung der Receptoren durch diese Substanzgruppe übereinstimmt.

Wenn man unter Berücksichtigung der von Montagu und von uns erhobenen Befunde noch einmal die Untersuchungen von Kewitz u. Reinert sowie von Konzett einer nachträglichen Überprüfung unterzieht, so ergeben sich auch daraus Analogien zu den hier beschriebenen Versuchsergebnissen, wenn auch die erstgenannten Autoren zunächst eine Beziehung zwischen chemischer Struktur der untersuchten Sympathomimetica und ihrer Wirkung auf die Erregungsübertragung an der vegetativen ganglionären Synapse nicht annehmen wollen. Ordnet man aber ihre Befunde nach den von uns angegebenen Konstitutionsmerkmalen, so läßt sich erkennen, daß die Adrenalin-Gruppe die Ach.-Empfindlichkeit der ganglionären Synapse steigern, während die Verbindungen vom Typ des Pervitin ohne OH-Gruppen die Ach.-Empfindlichkeit dieser synaptischen Struktur vermindern. Die geringfügigen Abweichungen, welche die Autoren wahrscheinlich die bestehenden Beziehungen übersehen ließen, sind wohl durch die Schwierigkeit und die Komplikationsmöglichkeiten der von ihnen angewandten Methodik zu erklären. Wir möchten also auf Grund der Ähnlichkeit unserer Ergebnisse mit den Befunden an vegetativen ganglionären und myoneuralen Synapsen die von uns in unserer ersten Mitteilung bereits diskutierte Annahme synaptischer Strukturen an den Ach.-empfindlichen Receptoren der peripheren Strombahn weiterhin beibehalten.

Dabei haben wir nach wie vor auch noch andere Erklärungsmöglichkeiten im Auge und sind bestrebt, dieses Problem weiter aufzuklären. So wäre es denkbar, daß die Phenylalkylamine je nach ihrer chemischen Konstitution die Aktivität der Acetylcholinesterase verändern, ebenso könnten die in Frage kommenden Substanzen auf verschiedenartige Weise mit den Ach.-Receptoren der jeweilig

untersuchten neuralen oder muskulären Zellelemente reagieren und sie aktivieren oder inaktivieren. Die Entscheidung für eine dieser Möglichkeiten können aber nur weitere Untersuchungen liefern. Es sei abschließend noch darauf hingewiesen, daß die Weiterführung unserer Untersuchungen möglicherweise auch Material für die Deutung der zentralerregenden Wirkung der OH-Gruppen-armen oder -freien Phenylalkylamine liefern könnte. Nach den bisherigen Ergebnissen scheint bei den einzelnen Derivaten der desensibilisierenden Wirkung an den synaptischen Strukturen eine erregende Wirkung am Zentralnervensystem zu entsprechen. Das Zustandekommen einer zentralen Erregung durch Ausschaltung hemmender neuraler Verbindungen ist ja eine in der Neurophysiologie durchaus übliche Vorstellung. Im Gegensatz dazu spielen im Hinblick auf die von uns beobachteten Wirkungen die eigentlichen sympathomimetischen Eigenschaften der Phenylalkylamine wohl keine Rolle. Befinden sich doch zum Beispiel in der Gruppe der sensibilisierenden Substanzen sowohl das Arterenol mit seiner ausgeprägten excitatorischen Wirkung auf die glatte Muskulatur als auch das Novodrin mit seiner mehr inhibitorischen Komponente. Man kann also wohl annehmen, daß die Phenylalkylamine gleichzeitig an verschiedenartitgen Receptoren angreifen können und daß die Schwierigkeiten ihrer klaren Gruppierung durch die Interferenz der dadurch hervorgerufenen unterschiedlichen Wirkungen zu erklären wäre.

Zusammenfassung

1. Mit der Methode der innervierten, isoliert durchströmten Organe wird die Beeinflussung der Reizung Acetylcholin-empfindlicher Receptoren durch 16 verschiedene Phenylalkylamine untersucht.

2. Es lassen sich Beziehungen zwischen der Struktur der Phenylalkylamine und ihrer Wirkung auf die Receptoren feststellen.

3. Derivate des 3,4-Dioxyphenyl mit einer alkoholischen OH-Gruppe am C-1-Atom der Seitenkette führen eine Sensibilisierung der Acetylcholin-empfindlichen Receptoren herbei.

4. Phenylalkylamine ohne OH-Gruppen am Ring und an der Seitenkette setzen die Empfindlichkeit der Receptoren für Acetylcholin herab oder heben sie vollständig auf.

5. Die Befunde werden zu den Ergebnissen in Beziehung gesetzt, die bei Untersuchungen an anderen synaptischen Strukturen erhalten wurden. Ihre Bedeutung für einige Probleme der Pharmakologie der Sympathomimetica wird diskutiert.

An dieser Stelle sei Herrn G. Otto für seine verständnisvolle technische Assistenz gedankt, die wesentlich zum Gelingen der Versuche beitrug.

Literatur

Bülbring, E.: J. of Physiol. **103**, 55 (1944). — Kewitz, H., u. H. Reinert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 311 (1954). — Konzett., H.: Helv. Physiol. Acta **8**, 245 (1950). — Matthies, H., B. Wiegershausen, G. Otto u. G. Scholz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 544 (1956). — Matthies, H.: Naturwissenschaften **44**, 39 (1957). — Montagu, K. A.: Nature (Lond.) **176**, 738 (1955). — Wiegershausen, B., G. Scholz u. H. Matthies: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck).

Dozent Dr. med. habil. H. Matthies, Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg, Magdeburg, Leipziger Str. 44

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 141—148 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. F. Hahn)

Abhängigkeit der N_2O-Narkoseschwelle von Erregungszustand und Stoffwechsel*

Von

W. Rummel, H. Jacobi, F. J. Kreutzer und E. von der Brelie

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. April 1957)

Carlsson u. Theander haben eine Methode angegeben, mit der sich die Narkoseschwelle für N_2O leicht und genau bestimmen läßt. Eine Senkung oder Erhöhung der Schwelle kann quantitativ manometrisch erfaßt werden. Damit ist eine Möglichkeit gegeben, die Ansicht zu überprüfen, die Höhe des Stoffwechsels sei ein Gradmesser für die Narkoseempfindlichkeit (Mac Intosh; Goodman u. Gilman).

Diese Anschauung geht auf Guedel zurück, der aus verständlichen Überlegungen in Übereinstimmung mit der Erfahrung Höhe des Stoffwechsels gleich Höhe des Erregungszustandes setzte und daraus ein Schema konstruierte, das die Auswirkung der Prämedikation auf die Tiefe der N_2O-Narkose veranschaulichen sollte. Bei der Bedeutung, die die Prämedikation in neuerer Zeit gerade auch für die N_2O-Narkose gewonnen hat, schien es interessant, durch Verwendung von nicht narkotisch wirkenden Sedativa wie Chloropromazin einerseits und stoffwechselwirksamen Stoffen wie Thyroxin andererseits zu prüfen, inwieweit eine solche Gleichsetzung von Stoffwechselhöhe und Erregungszustand gerechtfertigt ist.

Methode**

Es wird nur das Prinzip beschrieben, Einzelheiten sind in der Arbeit von Carlsson u. Theander zu finden. Das Versuchstier (Meerschweinchen 200—300 g; Ratten 150—200 g) sitzt in einer Überdruckkammer. Mit einem Manometer (Skaleneinteilung 0,1 kg/cm²) wird der N_2O-Partialdruck gemessen, bei dem Stell- und Haltereflexe soweit ausgefallen sind, daß das Tier sich beim Schaukeln des Kastens nicht mehr aufzurichten versucht. Die Kammer wird zu Beginn mit Sauerstoff gefüllt. Das Volumen ist so bemessen, daß für die Versuchsdauer kein O_2-Mangel eintritt. CO_2 wird durch Absorbermasse beseitigt. Das Ein- und Ausschleussen erfolgt stufenweise, so daß keine Caissonerscheinungen auftreten. Aus Gründen der Sicherheit wurde ein Druck von 2 kg/cm² nicht überschritten.

* Zur Erinnerung an Prof. H. Weese, dessen 60. Geburtstag am 18. 3. 1957 war.

** Wir danken Herrn Prof. Dr. Dr. Wirth und den Farbwerken Bayer für den Bau der Druckkammer und für die Überlassung von Versuchstieren.

Nachdem in Voruntersuchungen festgestellt war, daß die Narkoseschwelle des einzelnen Tieres während einer Versuchsperiode (2 Wochen) praktisch konstant bleibt, wurden für die verschiedenen Gruppen Tiere mit möglichst gleichhoher Schwelle aus einem größeren Kollektiv vorher ausgewählt. — Substanzen: Chloropromazin-HCl = N-(3′-Dimethylaminopropyl)-3-chlorphenothiazin (Megaphen, Bayer); Reserpin (Serpasil, CIBA); Methamphetamin = d-1-Phenyl-2-Methylamino-Propan (Pervitin, Temmler); Thyroxin (Hoffmann La Roche); Methylthiourazil; 2,4-Dinitrophenol.

Ergebnisse: I. Versuchsgruppe

In der ersten Versuchsgruppe wurde geprüft, ob durch den Einfluß von Chloropromazin und Reserpin auf den *Erregungszustand* die N_2O Empfindlichkeit erhöht und durch Methamphetamin dieser Effekt wieder aufgehoben werden kann.

Die Narkoseschwelle, d. h. der N_2O-Druck, bei dem Stell- und Haltereflexe ausgefallen sind, wurde bei jedem Tier 2mal vor und nach einer

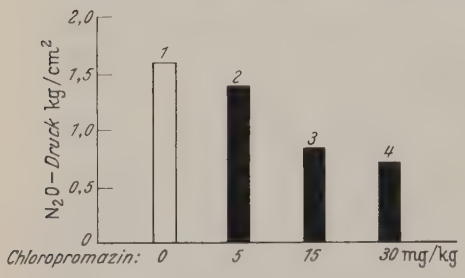


Abb. 1a

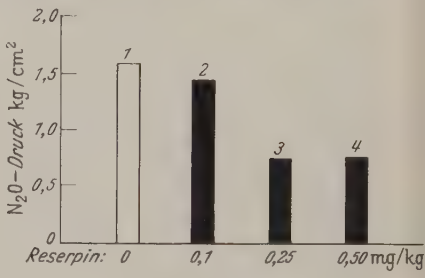


Abb. 1b

Abb. 1a. Narkoseschwelle für N_2O: 1,6 ± 0,31 kg/cm², n = 85 (1); 30 min nach Chloropromazin: 1,4 ± 0,38 kg/cm², n = 27 (2); 0,82 ± 0,26 kg/cm², n = 38 (3); 0,68 ± 0,18 kg/cm², n = 20 (4)

Abb. 1b. Narkoseschwelle für N_2O: 1,6 ± 0,31 kg/cm², n = 85 (1); Nach Reserpin: 1,45 ± 0,41 kg/cm² n = 25 (2); 0,67 ± 0,18 kg/cm², n = 20 (3); 0,79 ± 0,18 kg/cm², n = 20 (4)

entsprechenden Vorbehandlung ermittelt. In insgesamt 85 Versuchen ergab sich im Mittel ein Druck von 1,6 kg/cm² ± 0,31. Dabei war die individuelle Konstanz so, daß bei ein und demselben Tier zwischen 2 Versuchen keine höhere Differenz als 0,2 kg/cm² auftrat.

Abb. 1a zeigt die Wirkung verschiedener *Chloropromazin*-Dosen auf die Narkoseschwelle. Das Chloropromazin wurde 30 min vor der Narkose subcutan verabfolgt. 15 mg/kg wirkten noch nicht hypnotisch. Auch die Motilität war nicht so herabgesetzt, daß im Vergleich mit den Kontrollen ein Unterschied beobachtbar gewesen wäre. Erst bei 30 mg/kg waren die Tiere schläfrig, aber leicht weckbar. Die Schwellendosis liegt bei 5 mg/kg, d. h. hier wird schon bei einigen Tieren die N_2O-Empfindlichkeit deutlich verstärkt. Das Maximum der Wirkung ist bei 15 mg/kg erreicht, dabei ist die *Narkoseschwelle um 50% gesenkt.*

Die *Reserpin*-Dosis (Abb. 1b), die bei einigen Tieren schon deutlich die Schwelle für N_2O senkte, betrug 0,1 mg/kg. Eine maximale Senkung,

ebenfalls 50% unter die Norm, wurde mit 0,25 mg/kg erzielt. Die Testung erfolgte wegen der großen Latenz erst 3 Std nach s.c. Injektion. Im Gegensatz zu Chloropromazin schliefen hier die Tiere fest mit geschlossenen Augen (normalerweise ist das bei Meerschweinchen sonst nur schwer

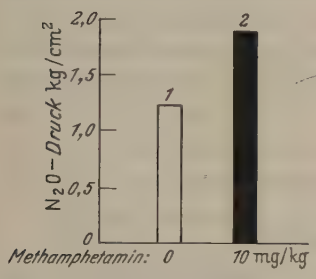


Abb. 2a

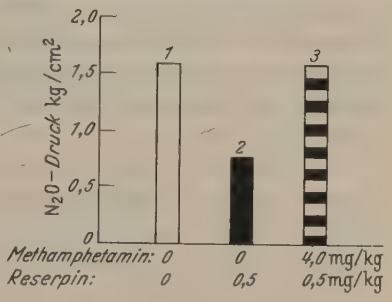


Abb. 2b

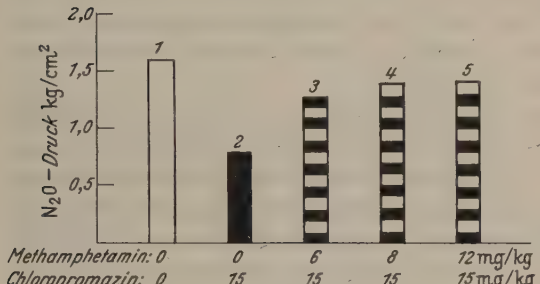


Abb. 2c

Abb. 2a. Narkoseschwelle für N_2O: 1,24 ± 0,19 kg/cm², n = 30 (1); Nach Methamphetamin: > 2,0 kg/cm², n = 15 (2)
Abb. 2b. Narkoseschwelle für N_2O: 1,6 ± 0,3 kg/cm², n = 30 (1); nach Reserpin: 0,79 ± 0,18 kg/cm², n = 20 (2); nach Reserpin und Methamphetamin: 1,6 ± 0,20 kg/cm², n = 15 (3)
Abb. 2c. Narkoseschwelle für N_2O: 1,6 ± 0,34 kg/cm², n = 60 (1); nach Chloropromazin: 0,82 ± 0,26 kg/cm², n = 38 (2); nach Chloropromazin und Methamphetamin: 1,27 ± 0,26 kg/cm², n = 15 (3); 1,39 ± 0,30 kg/cm², n = 15 (4); 1,47 ± 0,34 kg/cm², n = 13 (5)

zu beobachten). Noch nach 30 Std blieb in mehreren Fällen, die wir wiederholt testeten, die *Narkoseschwelle* bis zu 50% unter den Ausgangswert *gesenkt*.

Der Einfluß von *Methamphetamin* auf die Narkoseschwelle wurde deshalb geprüft, weil versucht werden sollte, ob die Senkung der Narkoseschwelle durch Chloropromazin und Reserpin wieder aufgehoben werden kann (Abb. 2a). Um zunächst die Wirkung von Methamphetamin allein zu erfassen, wurden Tiere ausgewählt, die besonders narkoseempfindlich waren, d. h. deren Schwelle unterhalb 1,5 kg/cm² lag, im Durchschnitt bei 1,24 kg/cm². Ein bis zwei Stunden nach Methamphetamin s.c. wurde die Narkoseschwelle erneut bestimmt und dabei die Dosis gesucht, bei der auch 2,0 kg/cm² N_2O zum Verlust von Stell- und Haltereflexen nicht ausreichten. Schon bei 2 mg/kg waren die Tiere erregt, die Exzitationserscheinungen unter N_2O ausgeprägter und die Narkoseempfindlichkeit zum Teil vermindert. Mit 10 mg/kg waren bei einem Druck von 2,0 kg/cm² noch 11 von 15 Tieren wach. Da wir mit dem Druck nicht höher gehen

konnten, ist nur festzustellen, daß die *Schwelle* mindestens um 60% der Norm *erhöht* wurde.

Mit einer Injektion von Methamphetamin $1^1/_2$ Std nach Reserpin läßt sich die Narkoseschwelle wieder zur Norm anheben (Abb. 2b). 4 mg/kg Methamphetamin reichen aus, um die Wirkung von 0,5 mg/kg Reserpin gerade zu kompensieren. Die Reserpinwirkung ist dabei auch äußerlich erkennbar aufgehoben. Die Tiere schlafen nicht mehr. Umgekehrt jedoch ist der Nagetrieb ein Ausdruck der Erregung, durch Methamphetamin noch erhalten.

Die Wirkung der dem Reserpin äquieffektiven Chloropromazindosis dagegen war durch Methamphetamin schwerer auszugleichen (Abb. 2c).

Diskussion: 1. Versuchsgruppe

Mit Diäthylbarbitursäure konnten Carlsson u. Theander schon eine Senkung der N_2O-Narkoseschwelle um etwa 65% erzielen. Die Dosis lag aber so hoch, 110 mg/kg, daß bei einer Reproduktion ihrer Versuche schon 10% unserer Tiere ohne N_2O Seitenlage einnahmen und die anderen sehr stark benommen waren. Dabei kam es also wohl zu einer einfachen Addition der Wirkung zweier Narkotica.

Die erhöhte N_2O-Empfindlichkeit nach Chloropromazin und Reserpin ist insofern interessant, als es sich dabei um Stoffe handelt, mit denen auch in hohen Dosen keine Narkose zu erzielen ist, mit anderen Worten Stell- und Haltereflexe bleiben bis zum Bereich toxischer Dosen erhalten. Die Wirkung beschränkt sich also auf bestimmte Areale des ZNS wie die Formatio reticularis, auf die die Wirkung der typischen Narkotica nie begrenzt bleibt. Trotzdem bewirken sie bereits in Dosen, die wie bei Chloropromazin das Verhalten der Tiere jedenfalls nicht sichtbar verändern, einen Ausfall der Stell- und Haltereflexe schon bei der halben N_2O-Menge. Chloropromazin unterschied sich dabei durch den rascheren Eintritt der Wirkung, die kürzere Dauer und dadurch, daß die sedative Wirkung äquieffektiver Dosen im äußeren Bild weniger in Erscheinung trat als bei Reserpin, hinzu kam, daß seine Wirkung sich durch Methamphetamin nicht so leicht aufheben ließ. Ein Antagonismus zwischen Methamphetamin und Chloropromazin wurde schon von Heim u. Haas an der Motilität der Maus festgestellt. Die Tatsache, daß Tripod, Bein u. Meier für Reserpin-Methamphetamin nur einen sehr schwachen Antagonismus fanden, braucht nicht in Widerspruch zu unseren Befunden zu stehen, da er an der Spontanmotilität der Maus untersucht wurde. Auch in unseren Versuchen zeigte sich, daß die mit Methamphetamin erhöhte Motilität (Nagetrieb), trotz einer Senkung der erhöhten Narkoseschwelle durch Reserpin zur Norm nicht sichtlich vermindert war.

Da durch Methamphetamin der Stoffwechsel gesteigert (Brauner) und durch Chloropromazin und Reserpin der Stoffwechsel, wenn auch

nicht unter den Ruheumsatz (Brendel) so doch gesenkt wird, kann im Hinblick auf die Stoffwechseltheorie der Narkose (Literatur siehe bei Rummel) die Frage aufkommen, ob hier nicht doch entsprechend dem Guedelschen Schema, die N_2O-Empfindlichkeit in Abhängigkeit vom Stoffwechsel erhöht oder erniedrigt wurde.

Zur Klärung der Frage, ob Erregungszustand und Stoffwechsel in jedem Fall so eng mit einander verknüpft sind, daß ein gesteigerter Stoffwechsel auch einen erhöhten Erregungszustand bedingt, soll der nächste Versuchsabschnitt beitragen.

Ergebnisse: II. Versuchsgruppe

Zur Beantwortung der Frage nach dem Einfluß des *Stoffwechsels* auf die N_2O-Narkoseschwelle, wurden Versuche mit Thyroxin, 2,4-Dinitrophenol und Methylthiourazil in stoffwechselwirksamer Dosierung durchgeführt.

Thyroxin wurde den Tieren täglich in einer Dosis von 0,5 mg/kg s.c. verabfolgt. Die Stoffwechselsteigerung zeigte sich nach 2—3 Tagen durch Gewichtsabnahme bei gesteigertem Futterverbrauch. Das Gewicht fiel von einem mittleren Ausgangsgewicht von 237 g zwischen dem 4. und 12. Tag auf 197 g ab. Brock u. Lorenz fanden am Meerschweinchen bei Dosen von 0,32 mg/kg eine Stoffwechselsteigerung über 40%.

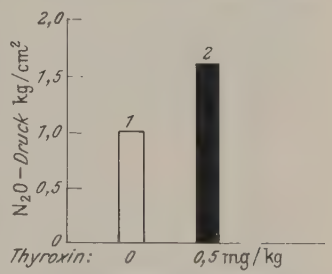


Abb. 3. Narkoseschwelle für N_2O: 1,0 ± 0,25 kg/cm², n = 10 (1); nach 0,5 mg/kg Thyroxin: 1,6 ± 0,22 kg/cm², n = 10 (2)

Die Tiere wurden für diese Gruppe in Vortestungen so ausgesucht, daß eine eventuelle Erhöhung der Narkoseschwelle möglichst deutlich zum Ausdruck kommen konnte. Die Schwelle lag vor der Behandlung im Mittel bei 1,0 ± 0,25 kg/cm². Nach Vorbehandlung mit Thyroxin *stieg* die *Narkoseschwelle* zwischen dem 4. und 12. Tag um 62% an (Abb. 3). Bei den Kontrollen veränderte sich die Narkoseempfindlichkeit nicht.

2,4-*Dinitrophenol* (DNP) wurde in Dosen angewandt, die schon 20—30 min nach der Injektion zu einer Stoffwechselsteigerung bis zu 100% führen (Feller; Terada u. Tainter). Neben Meerschweinchen wurden hier auch Ratten mit DNP in Dosen von 10—20 mg/kg s.c. vorbehandelt und in Abständen von 10—90 min nach der Injektion getestet.

Die Narkoseschwelle zeigte *keine* statistisch zu sichernde Änderung (Tabelle 1).

Mit *Methylthiourazil* (MTU) wurden Ratten 17 Tage lang gefüttert. Das MTU war in Kekse eingebacken, so daß die aufgenommene Menge durch Nachwiegen bestimmt werden konnte. Die Aufnahme betrug durchschnittlich 150 mg/kg vom 1. bis zum 10. Tage und 110 mg/kg vom 11. bis zum 17. Tage. Das sind Dosen, die nach Kopf u. Loeser den Stoffwechsel um 28% senkten.

Während und am Ende dieser Periode verschob sich die Narkoseschwelle nicht.

Die letzte Versuchsreihe galt der Frage, ob die durch *Thyroxin* erhöhte Narkoseschwelle *durch Chloropromazin* bzw. *Reserpin* wieder auf die Norm herabgesetzt werden kann (Abb. 4).

Tabelle 1.
Einfluß der Vorbehandlung mit 2-4-Dinitrophenol (DNP) auf die N_2O-Narkoseschwelle

DNP-Dosis in mg/kg s. c.	N_2O-Narkoseschwelle vor der Injektion	N_2O-Narkoseschwelle nach der Injektion
	Ratten	
10	1,4	1,2
10	1,4	1,4
10	1,5	1,5
10	1,5	1,5
	M = 1,45	M = 1,40
20	1,5	1,3
20	1,4	1,1
20	1,5	1,4
20	1,5	1,5
20	1,4	1,0
20	1,5	1,4
	M = 1,46 ± 0,05	M = 1,3 ± 0,2
	Meerschweinchen	
20	0,8	0,8
20	1,8	1,7
20	0,9	1,0
20	1,4	1,2
20	1,0	1,0
	M = 1,18	M = 1,14

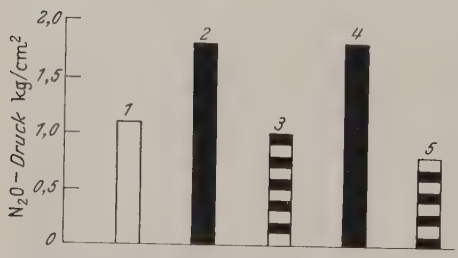


Abb. 4. Narkoseschwelle für N_2O: 1,1 ± 0,15 kg/cm², n = 10 (1); nach Thyroxin: 1,8 ± 0,15 kg/cm²: 1 n = 10 (2); Nach Thyroxin und Chloropromazin: 1,0 ± 0,22 kg/cm², n = 10 (3); nach Thyroxin, 1,8 ± 0,17 kg/cm², n = 10 (4); nach Thyroxin und Reserpin: 0,8 ± 0,26 kg/cm², n = 5 (5)

Bei den hierfür benutzten Tieren lag die Schwelle bei 1,1 ± 0,15 kg/cm² und stieg nach 3—6tägiger Injektion von 0,5 mg/kg Thyroxin auf 1,8 ± 0,15 kg/cm² an. 2—3 Std, nachdem diese Erhöhung festgestellt war, erhielten dieselben Tiere 15 mg/kg Chloropromazin und 30—45 min danach wurde erneut getestet. Dabei fiel die Schwelle wieder im Mittel auf 1,0 ± 0,22 kg/cm².

Diese Chloropromazindosis alleine senkte bei Kontrolltieren, die nicht unter Einwirkung von Thyroxin standen, die Schwelle von 1,1 ± 0,09 auf 0,76 ± 0,17 kg/cm². Nach Abklingen der Chloropromazinwirkung kehrte (24 Std später) die Narkoseschwelle wieder auf den alten durch Thyroxin erhöhten Wert zurück.

Fünf dieser Tiere wurden 1—2 Std später 0,25 mg/kg Reserpin injiziert und 3 Std nach Injektion wiederum die Narkoseempfindlichkeit bestimmt. Es ergab sich ein Abfall auf 0,8 ± 0,26 kg/cm², also etwas unter den Ausgangswert. Sowohl durch *Chloropromazin* als auch durch *Reserpin* läßt sich also die *Thyroxinwirkung aufheben*, d. h. die erhöhte Narkoseschwelle zur Norm senken.

Diskussion: II. Versuchsgruppe

Die gefundene Erhöhung der Narkoseschwelle durch Thyroxin mag zunächst nicht überraschen, zumal sie mit der allgemeinen Erfahrung einer schwereren Narkotisierbarkeit hyperthyreotischer Patienten in Einklang steht. Damit scheint auch Guedels Gleichsetzung von Stoffwechsel- und Erregungszustand gerechtfertigt. Die Tatsache jedoch, daß DNP keinen Einfluß auf die Narkoseschwelle hat, obwohl es den Stoffwechsel (nach Martius dem gleichen biochemischen Mechanismus zufolge) ebenfalls erhöht, läßt erkennen, daß für diesen Thyroxineffekt auf die Narkoseschwelle der metabolische Effekt nicht ausschlaggebend sein kann. Für die Erhöhung der Narkoseschwelle scheint vielmehr eine Wirkung auf das ZNS eine Rolle zu spielen, die dem Thyroxin zukommt und die dem DNP fehlt.

Eine derartige zentrale Thyroxinwirkung und ein entsprechender Unterschied in dieser Hinsicht zwischen Thyroxin und DNP konnte schon Issekutz nachweisen. Durch Morphin-Scopolamin konnte er die durch Thyroxin induzierte Stoffwechselsteigerung zu einem gewissen Teil aufheben und er zog daraus den Schluß, daß es neben der peripheren Thyroxinwirkung auch eine zentrale gibt. Die durch DNP erzielte Stoffwechselsteigerung konnte er dagegen durch Morphin-Scopolamin nicht beeinflussen.

Genau in Parallele zu der senkenden Wirkung von Morphin-Scopolamin (Issekutz) und Reserpin (Kuschke u. Gruner) auf den durch Thyroxin erhöhten Stoffwechsel steht hier die Senkung der durch Thyroxin erhöhten Narkoseschwelle durch Chloropromazin und Reserpin, zwei Stoffe, von denen wir wohl mit Recht annehmen dürfen, daß sie vorwiegend zentral angreifen. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß für den Antagonismus dieser beiden Pharmaka gegen Thyroxin — gemessen einmal am Stoffwechsel und das andere Mal an der Narkoseschwelle — zwei verschiedene Angriffspunkte in Frage kommen. Durch Ausschaltung einer zentralerregenden Komponente des Thyroxin durch Morphin-Scopolamin, Chloropromazin und Reserpin läßt sich nicht nur die Wirkung auf die Narkoseschwelle, sondern gleichzeitig auch jene Stoffwechselwirkung erklären.

Wenn mit Methylthiourazil nicht das Gegenteil der Thyroxinwirkung, eine Senkung der Narkoseschwelle, gefunden wurde, so könnte das entweder bedeuten, daß die angenommene zentrale Thyroxinwirkung nur eine Wirkung höherer Dosen ist oder aber, daß sich eine so weitgehende Ausschaltung des Thyroxin etwa wie beim Myxödem nicht erzielen ließ, so daß sich der Erregungszustand nicht so änderte, daß ein Effekt an der Narkoseschwelle faßbar wurde.

Eine Gleichsetzung von Stoffwechsel und Erregungszustand bei der Beurteilung der Narkoseempfindlichkeit — jedenfalls ganz allgemein — ist sicher nicht erlaubt (womit nichts über den praktischen Wert des Guedelschen Schemas gesagt sein soll). Es gibt Stoffwechselsteigerungen —

Beispiel DNP — ohne Einfluß auf die Narkoseschwelle und solche mit — Beispiel Thyroxin. Wenn auch eine Steigerung des Erregungszustandes zwangsläufig mit einer Steigerung des Stoffwechsels einhergeht, so muß umgekehrt nicht mit jeder Stoffwechselsteigerung eine entsprechende Erhöhung des Erregungszustandes verbunden sein.

Summary

1. The threshold for N_2O-anaesthesia decreases (50%) after Chloropromazine (15 mg./kg.) and Reserpine (0.25 mg./kg.).

2. Methamphetamine (10 mg./kg.) increases the threshold more than 60%.

3. The threshold lowered previously by Chloropromazine and Reserpine becomes normal under the influence of Methamphetamine.

4. Thyroxine also increases the threshold (62%), Dinitrophenol on the contrary has no influence.

5. The treshold increased by Thyroxine can be lowered to the normal value by Chloropromazine and Reserpine.

Literatur

Brauner, F., u. V. Lachnit: Wien. Z. inn. Med. **31**, 427 (1950). — Brendel, W., u. H. L'Allemand: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 87 (1955). — Brock, N., u. D. Lorenz: Arch. Internat. Pharmacodynamie **98**, 1 (1954). — Carlsson, A., u. G. Theander: Acta pharmacol. (Kopenh.) **2**, 227 (1946). — Feller, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 90 (1955). — Goodman, L. S., and A. Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: Macmillan 1955. — Guedel, A. E.: Inhalation Anaesthesia. New York: Macmillan 1951. — Heim, F., u. B. Haas: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 395 (1955). — Issekutz, B., J. Gergely and G. Hetenyi: Nature **163**, 363 (1949). — Kopf, R., A. Loeser u. G. Meyer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 256 (1949). — Kuschke, H. J., u. H. Gruner: Klin. Wschr. **1954**, 563. — Mac Intosh, R. R., and F. B. Bannister: Essentials of General Anaesthesia. Oxford: Blackwell 1945. — Martius, C.: 31. Conference et Rapports 3éme. Congrès inter. de Biochemie, Brüssel 1955. — Rummel, W.: Theorie der Narkose, in: H. Killian u. H. Weese: Die Narkose. Stuttgart: Thieme 1954. — Terada, B., and M. L. Tainter: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **54**, 454 (1935). — Tripod, J., H. J. Bein u. R. Meier: Arch. Internat. Pharmacodynamie **96**, 406 (1953).

Dr. W. Rummel, Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstr. 5

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 149—157 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg

Calorimetrische Messung der Durchblutung des Herzmuskels

Von

M. Kiese und G. Lange

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. April 1957)

Die am meisten angewandten Methoden zur fortlaufenden Registrierung der Durchblutung des Herzmuskels erfordern Eingriffe an den Gefäßen des Herzens, welche den Blutzufluß zum Herzen oder den Abfluß beeinträchtigen (Bubble-flow-Messung, Rotameter, Thermostromuhr-Element, Morawitz-Kanüle), Gregg (1950), Wegria (1951). Wir haben die Durchblutung des Herzmuskels durch ein calorimetrisches Verfahren in der Muskulatur selbst gemessen.

Gibbs (1933) hat als erster die Temperaturänderung eines ins Gewebe eingeführten stationär geheizten Körpers als Indicator für Änderungen der Durchblutung des Gewebes benutzt. Grayson (1952) hat das Verfahren zur Messung der Strömungsgeschwindigkeit weiterentwickelt, und Hensel, Ruef u. Golenhofen (1954a) haben die Technik des Verfahrens durch Konstruktion einer „Calorimetersonde" bereichert und damit die Durchblutung verschiedener Gewebe des Menschen (z. B. ruhende Muskulatur) der Messung erschlossen.

A. Versuchsanordnung

1. Prinzip. Die calorimetrische Messung der Herzmuskeldurchblutung wird mit einem Differentialthermoelement durchgeführt. Das Element enthält 2 hintereinandergeschaltete Lötstellen. Eine Lötstelle dient zur Messung der Muskeltemperatur. Die zweite Lötstelle wird aufgeheizt. Durch den Blutstrom wird Wärme von der aufgeheizten Lötstelle abtransportiert, so daß sich deren Temperatur in Abhängigkeit vom Blutstrom ändert. Die Differenz der beiden Thermoströme wird über ein spannungsempfindliches Spiegel-Galvanometer fortlaufend registriert. Durch dieses Verfahren wird eine scheinbare Wärmeleitzahl des durchbluteten Gewebes bestimmt, deren Größe von der Geschwindigkeit des Blutstroms durch das Gewebe abhängt.

2. Geheizter Körper und Thermoelemente. Zur Bestimmung der scheinbaren Wärmeleitzahl des Gewebes muß der geheizte Körper eine feste und möglichst unveränderliche Berührung mit dem untersuchten Gewebe haben. Deshalb wurden

statt einer starren Sonde Drähte von 0,1—0,16 mm Durchmesser in das Gewebe vorsichtig eingezogen. Diese werden von der Herzmuskulatur entsprechend der Zunahme der Krümmung bei der Kontraktion gebogen.

Der geheizte Körper bestand aus einem 4 mm langen Konstantandraht; er wurde mit einem gemessenen Wechselstrom aufgeheizt. Die Differenz zwischen seiner Temperatur und der des ungeheizten Gewebes wurde an einem Ende mit

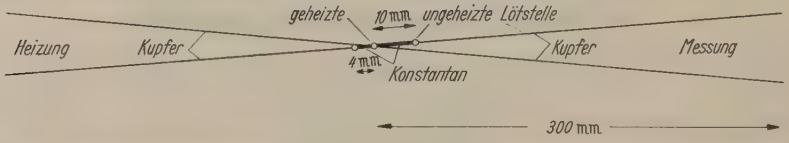


Abb. 1. Differentialthermoelement zur calorimetrischen Messung der Herzmuskeldurchblutung

einer Kupfer-Konstantan-Lötstelle gemessen, die gegen eine zweite, 10 mm vom Heizkörper entfernte Kupfer-Konstantan-Lötstelle geschaltet wurde (Abb. 1). Die Drähte wurden mit 20—30 Schichten des Brennlacks *Supradurit* L 54 V (Beck & Co., Hamburg) isoliert. Für jeden Tierversuch wurde ein neues Differentialthermoelement benutzt.

3. Meßanordnung. Wir verwendeten eine ähnliche Meßanordnung wie Hensel, Ruef u. Golenhofen (1954a). Das Schaltbild ist in Abb. 2 wiedergegeben.

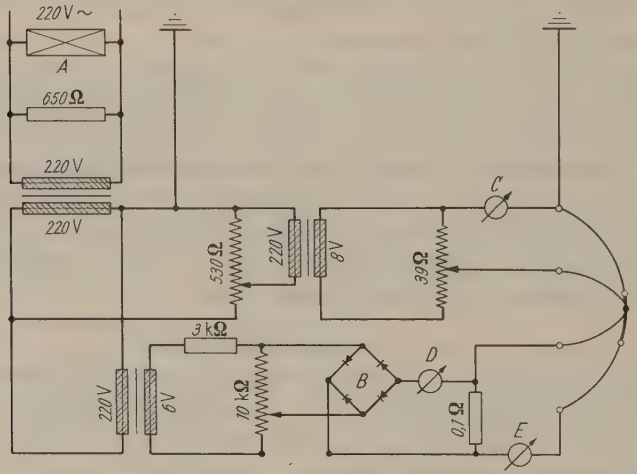


Abb. 2. Schaltbild der Meßanordnung. *A* Spannungsstabilisator; *B* Germaniumdioden in Grätz-Schaltung; *C* Vakuumthermoumformer mit Strommeßinstrument für 0—1 A zur Messung des Heizstroms. Die Skala des Instruments ist für J^2 geeicht. *D* Gleichstrom-Milliampèremeter (0—5 mA) zur Messung des Kompensationsstromes; *E* spannungsempfindliches Spiegelgalvanometer (innerer Widerstand 5—20 Ω, Meßbereich 20—30 μV) zur Registrierung

Mit Hilfe des Kompensationsgleichstroms kann die Übertemperatur der geheizten Lötstelle gegenüber der ungeheizten ermittelt werden: Da die Kompensationsspannung von einem 0,1 Ω-Präzisionswiderstand abgegriffen wird, entspricht 1 mA am Kompensationsstrommeßinstrument *D* 0,1 mV am Registrierinstrument *E*. Bei Erwärmung eines Kupfer-Konstantan-Elements um 1° C entsteht eine Spannung von 0,0428 mV. Dieser Temperaturdifferenz entspricht dann ein Kompensationsstrom von 0,428 mA.

Die Thermoelemente wurden in Substanzen mit bekannter Wärmeleitzahl geeicht. Wir verwendeten 10% Gelatine in Wasser (Wärmeleitzahl $\lambda = 1{,}21 \cdot 10^{-3}$ cal · cm^{-1} · sec^{-1} · °C^{-1}) bei 25° C. Aus dem Quadrat des Heizstroms (J^2 in Ampère), der Übertemperatur der geheizten gegenüber der ungeheizten Lötstelle (ϑ in °C) und der bekannten Wärmeleitzahl kann die Elementkonstante K errechnet werden:

$$K = \frac{\lambda \cdot \vartheta}{J^2} .$$

Für 45 Elemente des oben beschriebenen Bautyps lag K zwischen 0,0093 und 0,019.

In vielen Versuchen wurde an ein zweites Meßgerät eine Thermosonde nach Hensel, Ruef u. Golenhofen (1954a) angeschlossen und gleichzeitig mit der Herzmuskeldurchblutung die des Skeletmuskels gemessen.

4. Anlegen des Elements in der Herzmuskulatur. Wir verwendeten 7 bis 30 kg schwere Hunde in Chloralose-Urethan-Narkose (0,05 g Chloralose und 0,5 g Urethan/kg i.v.). Unter künstlicher Beatmung mit Luft wurde der Thorax in der Mittellinie eröffnet und der Herzbeutel so weit aufgeschlitzt, daß man mit zwei Fingern der linken Hand unter den linken Ventrikel fassen konnte.

Zum Anlegen des Elements in der Herzmuskulatur wurden die beiden freien Enden der Meßleitung vom Thermoelement an die Öse einer chirurgischen Halbnadel oder etwas aufgebogenen Rundnadel (Darmnadel), deren Krümmung etwa der Krümmung der Kammerwand entsprach und deren Länge von der Spitze zur Öse rund 3 cm betrug, gelötet. Zum Einnähen des Elements wurde die Nadel mit einem Nadelhalter geführt und das Herz mit zwei Fingern der anderen Hand von der Dorsalseite her leicht fixiert.

In allen Versuchen wurde das Element in die Muskulatur der Herzspitze eingeführt. Die Lage des Elements in der Muskulatur der Herzspitze wurde vom Verlauf der Gefäße bestimmt. In den meisten Versuchen lag das Element 0,5 bis 1 cm links und parallel der linken Längsfurche. Dieser Ort wurde gewählt, weil hier keine größeren Gefäße mehr verlaufen und das Ausmaß der Muskelkontraktionen und somit die Gefahr der Verlagerung des Elements gering sind. Beide Lötstellen lagen etwa 3 mm tief unter dem Epicard. Bei größeren Tiefen besteht die Gefahr, daß das Element zu nah am Ventrikellumen oder sogar darin liegt, denn die Stärke der Muskulatur der linken Kammer nimmt nach der Spitze zu beträchtlich ab. Zwar befinden sich hier die dicksten Trabeculae carneae, jedoch ist die Wand zwischen den Trabekeln bei kleineren Herzen oft nur 5 mm stark.

Nach dem Einnähen des Elements wurde die chirurgische Nadel wieder abgelötet. Über die frei aus dem Herzen ragenden Enden wurden Ventilgummischläuche gezogen, um Verklebungen der Drähte mit der Thoraxwand zu vermeiden. Dadurch wurden auch Fehler durch ungleiche Wärmeabfuhr entlang den Drähten vermieden. Die freien Drahtenden wurden an die kupfernen Leitungen zum Meßgerät gelötet oder geklemmt. Der Herzbeutel blieb aufgeschlitzt; der Thorax wurde durch Nähte oder Klemmen wieder verschlossen.

Eine Kontrolle der Elementlage durch Drosselung der arteriellen Zufuhr und anschließende reaktive Hyperämie wie am Skeletmuskel (vgl. Hensel, Ruef u. Golenhofen, 1954a und b) ist am Herzen nicht möglich. Lediglich der durch die Lage des Elements bedingte Temperaturunterschied zwischen den beiden ungeheizten Lötstellen kann mit Hilfe des Kompensationsstromes gemessen und bei der Berechnung von ϑ berücksichtigt werden. Wenn beide Lötstellen in gleicher Tiefe in der Muskulatur liegen, beträgt dieser Temperaturunterschied meist weniger als 0,1° C. Zur Messung der Durchblutung wurde die warme Lötstelle auf 1,2 bis 2,6° C über die Temperatur des Herzmuskels aufgeheizt.

Vor jedem Versuch prüften wir die Isolation des Thermoelements in 0,9%iger NaCl-Lösung. Wird die Isolation des Elements während des Versuches schadhaft, so kann Herztod durch Kammerflimmern eintreten. Diese Gefahr ist besonders groß, wenn nicht kapazitätsfrei gewickelte Transformatoren im Meßgerät verwendet werden. Deshalb wurde zwischen den Spannungsstabilisator und die Transformatoren für den Kompensations- und den Heizstrom ein 1:1-Transformator geschaltet und der zwischen den Transformatoren gelegene Stromkreis geerdet. Eine weitere Gefahr sind Induktionsströme und Aufladungen, die über das Herz zur Erdung des Meßgeräts abgeleitet werden. Elektrische Geräte, die mit dem Tier in Berührung kamen (z. B. Heizkissen), wurden deshalb mit Gleichstrom betrieben und das Versuchstier über seinen Kopfhalter geerdet.

Der arterielle Blutdruck in der A. carotis oder der A. femoralis wurde mit einem Glasplattenmanometer registriert.

B. Eichung und Auswertung der Messungen

1. Wärmeleitzahl und Durchströmungsgeschwindigkeit. Wenn die Eichkonstante K des Elements bekannt ist, kann die Wärmeleitzahl λ des durchbluteten Gewebes berechnet werden:

$$\lambda = K \cdot \frac{J^2}{\vartheta} \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot {}^\circ\text{C}^{-1}$$

(Ableitung der Gleichung siehe Hensel, Ruef u. Golenhofen, 1954a.)

Am Schluß jedes Versuches muß die Wärmeleitzahl λ_0 des nicht durchströmten Muskels am stillstehenden Herzen gemessen werden. Die Differenz $\lambda - \lambda_0 = \Delta\lambda$ ist durch den konvektiven Wärmetransport des Blutstroms bedingt und dient als Strömungsmaß.

Am ruhenden Skeletmuskel ist $\Delta\lambda$ der Durchströmungsgeschwindigkeit proportional (Hensel, Ruef u. Golenhofen, 1954a). Der arbeitende Herzmuskel ist jedoch wesentlich stärker durchblutet als der ruhende Skeletmuskel. Wir bestimmten deshalb am Herzmuskel die Abhängigkeit des $\Delta\lambda$ von der Durchströmungsgeschwindigkeit.

Nach Beendigung des Versuchs wurden dem noch lebenden Hund zur Hemmung der Blutgerinnung 1—3 ml Thrombostop[1] i.v. injiziert. Die Hohlvenen und die Aorta wurden unterbunden, das Herz von der A. anonyma aus mit 0,9%iger Kochsalzlösung oder Periston durchströmt und der Ausfluß aus dem rechten Vorhof als Maß der Durchströmung bestimmt. In Abb. 3 sind solche Eichkurven wiedergegeben.

Die Neigung der Kurven war je nach Lage des Elements verschieden. Die Kurven verliefen in einem weiten Bereich gradlinig. Viele wichen jedoch schon bei Durchströmungsgeschwindigkeiten von 80—100 ml/min/100 g Gewebe von der Geraden ab. Daher war $\Delta\lambda$ meist kein unmittelbares Maß für Änderungen der Herzdurchblutung und zeigte solche nur qualitativ an. Für die Messung der Durchblutungsgröße bzw. ihrer Änderung war in jedem Falle die Eichung des Thermoelements in der gegebenen Lage mit bekannter Durchströmung des Herzens erforderlich.

[1] Turon AG, Frankfurt/Main.

2. Vergleich der calorimetrischen Methode mit der N_2O-Methode von Kety u. Schmidt. In 5 Versuchen haben wir die Herzmuskeldurchblutung gleichzeitig mit der calorimetrischen Methode und der N_2O-Methode nach Kety u. Schmidt (1945) gemessen. (Durchführung nach Eckenhoff et al. (1948) an Hunden in Chloralose-Urethan-Narkose.) Während einer Kontrollperiode von etwa 60 min wurde die Ruhedurchblutung mit N_2O bestimmt. Dann wurde eine i.v. Dauerinfusion mit Theophyllin durchgeführt, bis sich der Ausschlag des Registriergalvanometers nicht mehr änderte, und erneut die Durchblutung mit N_2O gemessen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt. In allen Versuchen war die Durchblutung unter der Theophyllininfusion größer als 90 ml/min/100 g (N_2O-Methode). Bei der isolierten Durchströmung

Tabelle 1. *Vergleiche der calorimetrischen Methode mit der N_2O-Methode von* Kety *und* Schmidt.
An 5 narkotisierten Hunden wurde die Durchblutung des Herzmuskels gleichzeitig mit beiden Methoden vor und während einer intravenösen Dauerinfusion von Theophyllin gemessen

	Calorimetrische Messung cal · cm^{-1} · sec · $°C^{-1}$	Eichung d. calorimetr. Messung ml/min/100 g	Kety u. Schmidt-Methode ml/min/100 g
1. vor der Infusion	0,00072	—	92,7
0,39 mg Theophyllin/kg/min i.v.	0,00085	—	138,0
	+18%	—	+49%
2. vor der Infusion	0,00090	—	100,8
1,22 mg Theophyllin/kg/min i.v.	0,00109	—	145,8
	+21%	—	+45%
3. vor der Infusion	0,00035	51,0	45,0
1 mg Theophyllin/kg/min i.v.	0,00066	115,0	95,0
	+89%	+125%	+111%
4. vor der Infusion	0,00080	90,0	91,8
1,52 mg Theophyllin/kg/min i.v.	0,00096	126,0	122,0
	+20%	+40%	+33%
5. vor der Infusion	0,00036	59,0	66,0
1 mg Theophyllin/kg/min i.v.	0,00059	101,0	109,5
	+64%	+71%	+66%

toter Herzen bestand oberhalb dieser Strömungsgeschwindigkeit keine Proportionalität mehr zwischen Durchströmung und Änderung der Wärmeleitzahl (vgl. Abb. 3, S. 154). Dementsprechend war auch in den Versuchen an lebenden Hunden die Zunahme der Wärmeleitzahl (cal · cm^{-1} · sec^{-1} · $°C^{-1}$) kleiner als die Durchblutungszunahme, und zwar um so kleiner, je höher die Ruhedurchblutung vor der Theophyllininfusion war. Durch nachträgliche Eichung (isolierte Durchströmung

der Herzen nach dem Versuch) wurden die den Wärmeleitzahlen entsprechenden Durchblutungsgeschwindigkeiten erhalten. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der N_2O-Methode überein.

3. Vergleich der calorimetrischen Messung mit dem Coronarsinusausfluß im Herz-Lungen-Präparat. An 2 Herz-Lungen-Präparaten von Hunden wurden gleichzeitig die Herzmuskeldurchblutung mit der

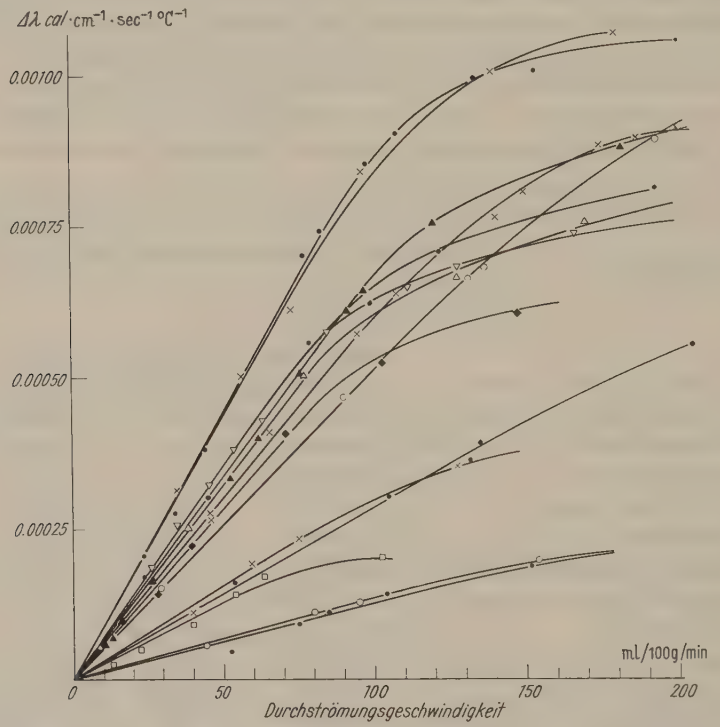


Abb. 3. Abhängigkeit der Änderung der Wärmeleitzahl ($\Delta\lambda$) von der Durchströmung des Herzmuskels. Messungen an stillstehenden, von der Aorta aus durchströmten Herzen nach Beendigung des Versuchs am Tier. Jede Kurve ist nach den Daten eines Herzens gezeichnet

calorimetrischen Methode und der Coronarsinusausfluß mit der Morawitz-Kanüle gemessen. In Abb. 4 ist das Ergebnis eines Versuches dargestellt.

In diesem Versuch wurden Änderungen der Herzmuskeldurchblutung hervorgerufen durch Druck- und Volumenbelastung des Herzens und durch Injektionen von Theophyllin, X 244 A (= 7-Äthylaminoäthyl-1,3-dimethylxanthinchlorhydrat) und Nitroglycol (= Äthylenglykoldinitrat) in den venösen Zufluß. Coronarsinusausfluß und $\Delta\lambda$ änderten sich gleichsinnig, jedoch waren wie bei den Versuchen an toten Herzen und an lebenden Hunden die Änderungen von $\Delta\lambda$ den Änderungen des

Coronarsinusausflusses, besonders bei großen Strömungsgeschwindigkeiten, nicht proportional.

Die unter 2. und 3. beschriebenen Ergebnisse stimmen überein mit den calorimetrischen Strömungsmessungen, die Hensel, Ruef u. Golenhofen (1954a) an isolierten Schafmilzen und Graf, Golenhofen und Hensel (1957) an isolierten Hundelebern durchgeführt haben. Einige

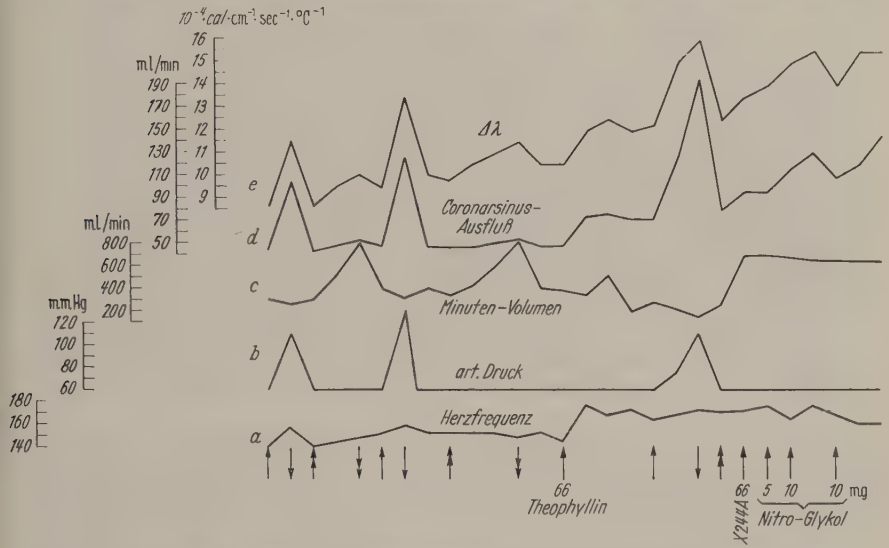


Abb. 4. Gleichzeitige Messung des Coronarsinusausflusses und der Änderung der Wärmeleitzahl $\Delta\lambda$ am Herz-Lungen-Präparat vom Hund. *a* Herzfrequenz, *b* arterieller Blutdruck, *c* peripheres Minutenvolumen, *d* Coronarsinusausfluß, *e* calorimetrische Messung der Herzmuskeldurchblutung ($\Delta\lambda$). ↑ ↓ Erhöhung bzw. Verminderung des peripheren Widerstandes. ↟ ↡ Vermehrung bzw. Verminderung des Minutenvolumens

ihrer Eichkurven weichen sogar schon bei Durchströmungsgeschwindigkeiten von 50 ml/min/100 g von der Geraden ab.

4. Wir prüften schließlich noch in Modellversuchen und am Herz-Lungen-Präparat vom Hund, ob die calorimetrische Methode für die Strömungsmessung in größeren Gefäßen (z. B. Bulbus Aortae) geeignet ist. Die Wärmeabfuhr ist jedoch außer von der Strömungsgeschwindigkeit auch von Pulsform und -frequenz abhängig. Die Thermoelemente können also nicht für die Messung der Strömung in größeren Gefäßen verwendet werden.

5. Beispiele der Registrierung. Registrierbeispiele sind in Abb. 5 wiedergegeben. Besonders an druckpassiven Durchblutungsänderungen, z. B. zu Beginn der Theophyllinwirkung und am Ende der Registrierung in Abb. 5B, ist zu erkennen, daß die Registrierung der Wärmeleitzahl infolge der Trägheit des thermoelektrischen Meßsystems gegenüber der Blutdruckregistrierung um einige Sekunden verschoben ist. In der ersten

Skala neben den Registrierbeispielen ist die Änderung der Wärmeleitzahl $\Delta\lambda$ angegeben. Die absoluten Wärmeleitzahlen des durchbluteten Gewebes sind zu errechnen aus $\lambda = \Delta\lambda + \lambda_0$. In 25 Versuchen wurde $\lambda_0 = 0{,}00107 \pm 0{,}000073$ cal · cm^{-1} · sec^{-1} · ° C^{-1} gefunden.

Herrn Dr. Klaus Resag danken wir für seine Hilfe bei der Durchführung einiger Untersuchungen.

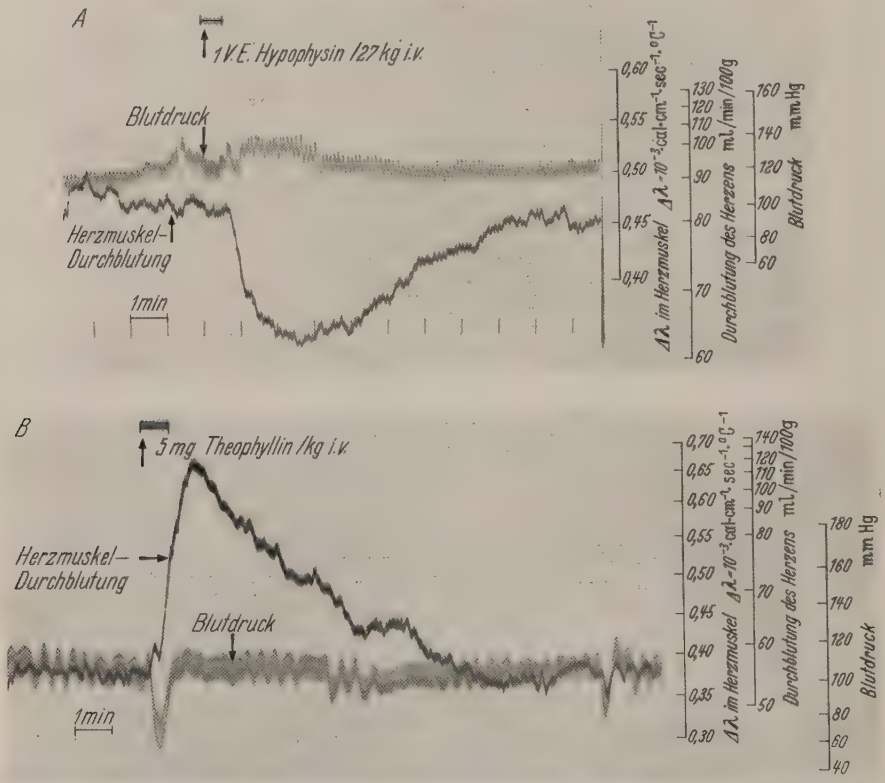


Abb. 5. Registrierung der Herzmuskeldurchblutung mit der calorimetrischen Methode und des arteriellen Blutdrucks bei 2 Hunden in Chloralose-Urethan-Narkose. *A* Hund 27 kg. 1 VE Hypophysin i.v. *B* Hund 14 kg. 5 mg Theophyllin/kg i.v.

Zusammenfassung

Nach dem von F. A. Gibbs angewandten Prinzip der Messung der Gewebsdurchblutung durch Bestimmung der von einem stationär aufgeheizten Körper abgeführten Wärmemenge wurde die Durchblutung des Herzmuskels von Hunden gemessen und registriert.

Im Bereich der physiologischen Durchblutung des Herzmuskels ist die Änderung der mit dem beschriebenen Verfahren gemessenen

Wärmeleitzahl des Gewebes den Änderungen der Durchblutung meist nicht proportional. Durch Eichung der angewandten Elemente im untersuchten Herzmuskel können aus den Wärmemessungen absolute Durchblutungsgrößen ermittelt werden.

Literatur

Eckenhoff, J. E., J. H. Hafkenschiel, M. H. Harmel, W. T. Goodale, M. Lubin, R. J. Bing and S. S. Kety: Measurement of coronary blood flow by the nitrous oxide method. Amer. J. Physiol. **152**, 356 (1948). — Gibbs, F. A.: A thermoelectric blood flow recorder in the form of a needle. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **31**, 141 (1933). — Graf, K., K. Golenhofen u. H. Hensel: Fortlaufende Registrierung der Leberdurchblutung mit der Wärmeleitsonde. Pflügers Arch. **264**, 44 (1957). — Grayson, J.: Internal calorimetry in the determination of thermal conductivity and blood flow. J. of Physiol. **118**, 54 (1952). — Gregg, D. E.: Coronary circulation. Philadelphia: Lea and Febiger 1950. — Hensel, H., J. Ruef u. K. Golenhofen: Fortlaufende Registrierung der Muskeldurchblutung am Menschen mit einer Calorimetersonde. Pflügers Arch. **259**, 267 (1954a). — Die Muskeldurchblutung und Hautdurchblutung des Menschen bei Einwirken vasoaktiver Substanzen. Z. Kreislaufforsch. **43**, 756 (1954b). — Kety, S. S., and C. F. Schmidt: The determination of cerebral blood flow in man by the use of nitrous oxide in low concentrations. Amer. J. Physiol. **143**, 53 (1945). — Wegria, R.: Pharmacology of the coronary circulation. Pharmacol. Rev. **3**, 197 (1951).

Prof. Dr. M. Kiese, Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen (Neckar)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 158—169 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg

Hämiglobinreduktase*

Von

Manfred Kiese, Claus Schneider und Hans-Dierck Waller

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Februar 1957)

Bei Untersuchungen über die Reduktion von Farbstoffen in roten Zellen (Kiese 1944) haben wir in den roten Zellen ein Ferment gefunden, das Wasserstoff von hydriertem Triphosphopyridinnucleotid (TPN) auf Methylenblau und andere reversibel reduzierbare Farbstoffe überträgt. Da das Ferment in rohen Präparaten mit geringer Anreicherung auch Hämiglobin reduzierte, wurde es als Hämiglobinreduktase bezeichnet. Seine Mitwirkung bei der Reduktion von Farbstoffen in intakten Erythrocyten wurde durch Untersuchung der Stoffwechselprodukte in roten Zellen und Hämolysaten gezeigt (Kiese 1949). Später haben wir erkannt, daß dies Ferment auch Nitrosobenzol schnell reduziert und daß durch seine Wirkung der Kreisprozeß unterhalten wird, durch den Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol eine Vielzahl von Äquivalenten Hämoglobin zu Hämiglobin oxydieren können (Kiese, Reinwein, Waller 1950, Kiese u. Waller 1950).

Wir beschreiben in dieser Arbeit die Anreicherung der Hämiglobinreduktase aus roten Zellen des Menschen auf den 1000fachen Reinheitsgrad des Zustandes in Erythrocyten und einige Eigenschaften des Ferments. Die folgende Arbeit (Kiese, Resag u. Schneider 1957) enthält Untersuchungen über die Reduktion von Nitrosobenzol und den Kreisprozeß der Hämiglobinbildung mit dem gereinigten Ferment.

Hämiglobinreduktase ist in roten Zellen nur in sehr niedriger Konzentration vorhanden. Unsere Präparate waren trotz der starken Anreicherung nicht rein. Die Empfindlichkeit des Ferments erschwerte seine Reinigung und verursachte schlechte Ausbeuten.

Über die Konstitution des Ferments sind sichere Aussagen noch nicht möglich, weil unsere Fermentpräparate noch unbekannte Mengen anderer Proteine enthielten. Aus den Fermentpräparaten wurde Flavinadenindinucleotid isoliert. Seine Menge war gering. Wenn Hämiglobinreduktase ein gelbes Ferment ist, dann hat sie bei der Reaktion mit Methylenblau und TPNH eine hohe Wechselzahl und ist ebenso wirksam

* Kinetik der Hämiglobinbildung XIV.

wie Diaphorase aus Herzmuskel. Unsere wirksamsten Präparate (150 Einheiten je Milligramm Protein) hätten dann einen Reinheitsgrad von 0,1—0,2.

Die Reduktion von Methylenblau wurde als Test bei der Anreicherung des Ferments benutzt. Die Reduktion von Nitrosobenzol ist in Abb. 1 dargestellt. Als Indicator für das durch Reduktion des Nitrosobenzols gebildete Phenylhydroxylamin diente die Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und Sauerstoff, so daß in dem Ansatz der Kreisprozeß der Hämiglobinbildung wie im intakten Erythrocyten ablief. Nach 30 min hatte jede Molekel Nitrosobenzol im Mittel 30 Äquivalente Hämiglobin gebildet.

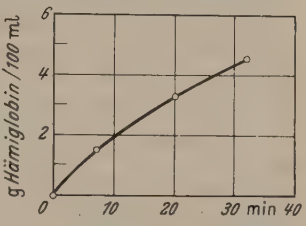


Abb. 1. Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol und Hämiglobinreduktase. Hämiglobinreduktase 160 E/100 ml, Hämoglobin (frei von Zwischenferment und Hämiglobinreduktase) 15 g/100 ml, Nitrosobenzol 10^{-4} Mol·l^{-1}. Gehalt an Hexose-6-phosphat, TPN, Zwischenferment und Puffer s. S. 161. Gasraum: Luft. pH 7,4, Temperatur 37° C

Hämiglobin wurde von unseren Fermentpräparaten nicht reduziert. Entweder ist bei der Reinigung des Ferments ein Co-Faktor verloren gegangen, der für die Reduktion des Hämiglobins durch unser Ferment erforderlich ist, oder die Reduktion des Hämiglobins im Erythrocyten durch hydriertes TPN erfolgt durch ein anderes, von dem jetzt isolierten verschiedenes Ferment. Wir behalten die Bezeichnung „Hämiglobinreduktase" für das Ferment bei. Vielleicht wird nach der endgültigen Aufklärung der enzymischen Hämiglobinreduktion und der physiologischen Funktion der „Hämiglobinreduktase" eine andere Bezeichnung des Ferments erforderlich.

In einer kurzen Mitteilung haben Huennekens u. Gabrio (1954) über Reinigung der Hämiglobinreduktase berichtet, genauere Angaben über ihr Verfahren der Fraktionierung mit Ammoniumsulfat und Alkohol sowie den Grad der Anreicherung des Ferments jedoch nicht gemacht.

Den Einfluß von Atebrin, das verschiedene gelbe Fermente hemmt, auf die Reduktion von Methylenblau durch Hämiglobinreduktase in Hämolysaten von Ratten-Erythrocyten hat Foulkes (1951) untersucht. Er fand, daß Atebrin in der Konzentration von $4 \cdot 10^{-4}$ Mol · l^{-1} die Reduktion von Methylenblau beschleunigte; höhere Konzentrationen ($2 \cdot 10^{-3}$ Mol · l^{-1}) hemmten die Reaktion.

Methoden

Triphosphopyridinnucleotid (TPN) wurde aus Schweineleber gewonnen. Nach der Methode von Kornberg u. Horecker (1953) wurde das TPN als Quecksilberverbindung gefällt, diese mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das freie TPN mit Aceton gefällt, getrocknet und im Vakuum bei 2° C aufbewahrt. Das Präparat enthielt etwa 8% TPN.

Hexose-6-phosphat (Robison-Ester) wurde nach der Methode von Warburg u. Christian (1932) hergestellt.

Flavinadenindinucleotid (FAD) wurde nach Dimant, Sanadi u. Huennekens (1952) aus Homogenaten von Schweineleber mit Trichloressigsäure extrahiert. Aus der bis zu schwach saurer Reaktion abgestumpften Lösung wurde das FAD nach Warburg, Christian u. Griese (1938) mit Phenol extrahiert, als Silber- und Quecksilberverbindung gefällt. Die Papierchromatographie des Präparates nach Crammer (1948) ergab, daß es neben FAD noch Flavinmononucleotid (FMN) enthielt.

Hämoglobin frei von Zwischenferment und Hämiglobinreduktase wurde durch Adsorption der Fermente aus Hämolysaten roter Zellen vom Hunde an Aluminiumhydroxyd erhalten [siehe Kiese, Resag, Schneider (1957)].

Calciumphosphat-Gel zur Proteinadsorption wurde nach Keilin u. Hartree (1938) dargestellt. Das durch Dekantieren von Chlorid gereinigte Gel wurde 10 min auf der 8 l-Zentrifuge von Stock zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Gel mit der gleichen Menge Wasser durch einen Ultra-Turrax homogeniert.

Altes gelbes Ferment und Zwischenferment wurden im gleichen Arbeitsgang gewonnen.

Bierhefe der Brauerei Ihring-Melchior in Lich wurde in Kübeln mit Leitungswasser gewaschen und im letzten Waschwasser (5—10faches Volumen der Hefe) 2—3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis schwacher Schwefelwasserstoffgeruch wahrnehmbar wurde. Dann wurden die Hefezellen auf der 8 l-Zentrifuge abzentrifugiert, je Kilogramm mit 550 ml Toluol von 40° C versetzt und im Wasserbad von 37° C unter Rühren auf 37° C erwärmt. Zur vollständigen Plasmolyse blieb der Ansatz noch 2 Std bei Zimmertemperatur stehen. Nach Zusatz von 1100 ml Wasser wurde der Ansatz über Nacht im Kühlraum aufbewahrt. Durch Zentrifugieren wurden Zellreste und Toluol von der wäßrigen Lösung getrennt. Diese wurde zur völligen Klärung mehrmals durch dünne Schichten von Kieselgur, die mit verdünnter Salzsäure gewaschen war, gesaugt. Die klare gelbe Lösung, etwa 1200 ml, enthielt ungefähr 65 mg Trockensubstanz, davon etwa 30 mg Protein je Milliliter. Bei 2° C wurde die Lösung bis zum Sättigungsgrad 0,5 mit festem Ammoniumsulfat versetzt (352 g Ammoniumsulfat zur Analyse Merck je Liter). Ohne den Niederschlag abzutrennen wurde im Wasserbad für 40 min auf 40° C erwärmt, auf 0° C abgekühlt, der Niederschlag auf der Zentrifuge abgetrennt und verworfen. Die Ammoniumsulfatkonzentration wurde bei 2° C auf den Sättigungsgrad 0,6 erhöht (70 g Ammoniumsulfat je Liter) und die Lösung mit 2 n Essigsäure auf p_H 4,8 angesäuert. Der Niederschlag enthielt Zwischenferment (siehe unten) und altes gelbes Ferment. Nach Abtrennen des Niederschlags auf der Zentrifuge wurde aus ihm mit Wasser eine etwa 2%ige Proteinlösung hergestellt. Diese wurde in Zellophanschläuchen 2 Tage lang bei 2° C gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert. Dabei fiel Zwischenferment aus (siehe unten). Das alte gelbe Ferment wurde nach Weygand u. Stocker (1937) und Weygand u. Birkofer (1939) an Aluminiumhydroxyd adsorbiert, gereinigt und gefriergetrocknet. Berechnet aus der Extinktion der Lösung, ihrem Proteingehalt und den Extinktionskonstanten des alten gelben Ferments (Theorell 1935) hatten die Präparate einen Reinheitsgrad von 0,85.

Glucose-6-phosphatdehydrogenase (Zwischenferment) wurde bei der oben beschriebenen Darstellung des alten gelben Ferments aus Bierhefe gewonnen. Das Zwischenferment wurde zusammen mit dem alten gelben Ferment aus dem sauren Hefeplasmolysat mit Ammoniumsulfat beim Sättigungsgrad 0,6 gefällt. Aus der Lösung des Niederschlags fiel bei der Dialyse gegen Wasser etwa ein Drittel des Zwischenferments aus, während gelbe Fermente fast vollständig in Lösung blieben.

Der Niederschlag, der etwa 15% der in Plasmolysat vorhandenen Zwischenfermentmenge enthielt, wurde auf der Zentrifuge abgetrennt und in 0,65%iger Natriumbicarbonatlösung gelöst. In diesen Präparaten war der Reinheitsgrad auf das 10fache des im Plasmolysat erhöht. Sie nahmen mit Methylenblau, Hexose-6-Phosphat und TPN nur noch langsam Sauerstoff auf. Durch Gefriertrocknung der Fermentpräparate wurde die Sauerstoffaufnahme mit Methylenblau ganz oder bis auf einen belanglosen Rest beseitigt, während die Aktivität (Sauerstoffaufnahme mit altem gelben Ferment) erhalten blieb. In getrocknetem Zustand waren die Präparate bei 2° C viele Monate ohne wesentlichen Aktivitätsverlust haltbar. Aktivitätsbestimmung siehe unten.

Alle Arbeiten mit Proteinen wurden im Kühlraum bei 2° C durchgeführt. Zur Fraktionierung mit Alkohol oder Aceton wurden die organischen Lösungsmittel auf —10° C abgekühlt und die Gemische bis zum Abtrennen der Niederschläge in der gekühlten Zentrifuge im Kältebad von —10° C gehalten.

Messung der Fermentaktivitäten

a) Glucose-6-phosphatdehydrogenase (Zwischenferment). Die Aktivität des Zwischenferments wurde manometrisch durch Messung der Sauerstoffaufnahme nach Zusatz von altem gelben Ferment gemessen. In den Ansätzen war die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme der Konzentration des Zwischenferments proportional bis zu einer Geschwindigkeit von 5 μl Sauerstoff je Minute. Altes gelbes Ferment wurde im Überschuß zugesetzt.

Die Ansätze hatten ein Volumen von 2 ml und enthielten

Hexose-6-phosphat	5 mg
TPN-Präparat	3 mg
Altes gelbes Ferment	$2 \cdot 10^{-8}$ Mole
Dinatriumäthylendiamintetracetat	$2 \cdot 10^{-6}$ Mole
Triäthanolamin-HCl-Puffer 0,1 mol p_H 7,4	0,2 ml
Zwischenferment	
Wasser	ad 2,0 ml

Der Zusatz von Äthylendiamintetraacetat steigerte die Wirkung des Zwischenferments.

Als Einheit der Zwischenfermentaktivität wurde die Aufnahme von 3,5 μl Sauerstoff je Minute bei 37° C in diesem Ansatz gebraucht. Zur Messung der „Methylenblau-Aktivität" der Zwischenfermentpräparate (Sauerstoffaufnahme mit Methylenblau statt altem gelbem Ferment) wurden den gleichen Ansätzen statt altem gelbem Ferment $2 \cdot 10^{-7}$ Mole Methylenblau zugesetzt.

b) Hämiglobinreduktase. Hämiglobinreduktase reagiert nicht mit Sauerstoff, aber mit Methylenblau. Als Maß der Aktivität der Hämiglobinreduktase wurde die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme im System Hexose-6-phosphat, Zwischenferment, TPN, Hämiglobinreduktase und Methylenblau gewählt.

Die Ansätze zur Bestimmung der Hämiglobinreduktase-Aktivität hatten folgende Zusammensetzung:

Hexose-6-phosphat	5 mg
TPN-Präparat	3 mg
Zwischenferment	1 Einheit
Methylenblau	$2 \cdot 10^{-7}$ Mole
Dinatriumäthylendiamintetraacetat	$2 \cdot 10^{-6}$ Mole
Triäthanolamin-HCl-Puffer 0,1 mol p_H 7,4	0,2 ml
Hämiglobinreduktase	
Wasser	ad 2,0 ml

Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme dieser Ansätze war der Konzentration an Hämiglobinreduktase nicht proportional. Darum wurde zur Ermittlung der Aktivität eines unbekannten Fermentpräparates eine Eichkurve hergestellt, welche die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme von der Hämiglobinreduktasekonzentration darstellt (Abb. 2). Als Einheit wurde die Wirkung von 30 γ Protein eines zufälligen Präparates gewählt. Für die Aktivitätsbestimmung wurden nur solche Mengen eines unbekannten Präparates ausgewertet, die im Testansatz Sauerstoffaufnahmen von 0,5—2,0 μl je Minute bewirkten.

Manometrische Messungen wurden mit der Apparatur von Warburg durchgeführt. In die Birne wurde bei den Messungen der Aktivität isolierter Fermente das Hexose-6-phosphat gegeben, bei den Messungen an intakten roten Zellen das Methylenblau. Der Einsatz enthielt 0,2 ml 7%ige Kalilauge und einen Streifen Filtrierpapier. Im Gasraum war Luft. Alle Messungen wurden bei 37° C ausgeführt; Schüttelgeschwindigkeit 130—150 je Minute.

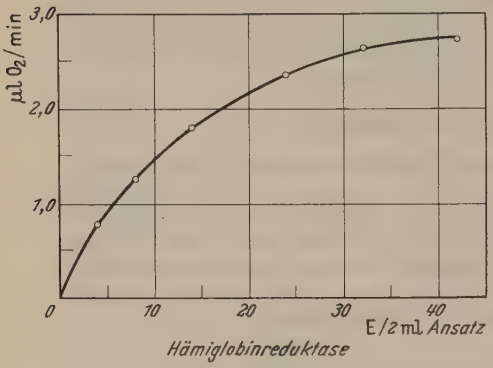


Abb. 2. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reduktion von Methylenblau (Sauerstoffaufnahme) von der Konzentration der Hämiglobinreduktase. Zusammensetzung des Ansätze s. S. 161. pH 7,4, Temperatur 37° C

Der Proteingehalt von Fermentlösungen wurde mit der Biuret-Reaktion nach Gornall, Bardawill u. David (1948) bestimmt. Die Lichtabsorption der Lösungen bei 546 mμ wurde im Photometer von Havemann gemessen.

Hämiglobin wurde durch Messung der Extinktionszunahme in 0,02 mol Phosphat pH 6,8 bei 546 und 577/79 mμ nach Zugabe von Cyanid bestimmt, Hämoglobin nach Oxydation mit Ferricyanid als Hämiglobin. Die Messungen wurden im Photometer von Havemann durchgeführt.

Extinktionsmessungen an Präparaten der Hämiglobinreduktase und des alten gelben Ferments wurden mit den Spektrophotometern von Beckman und Zeiß durchgeführt.

Fluorescenzmessungen zur Bestimmung von Flavinen wurden mit einem RCA-Sekundärelektronenvervielfacher durchgeführt. Licht einer Quecksilberspektrallampe von Osram, das mit dem Schott-Filter UG2 (3 mm) gefiltert war, fiel auf eine Quarz-Cuvette. Das senkrecht zum einfallenden UV-Licht ausgestrahlte Fluorescenzlicht wurde nach Durchgang durch die Schott-Filter GG 9, GG 10 und GG 13 (je 3 mm) gemessen. Die Eichung erfolgte mit Riboflavin. 0,005 γ Riboflavin konnten noch gut bestimmt werden.

Versuche

1. Ausgangsmaterial

Die Wirkung reversibel reduzierbarer Farbstoffe in Erythrocyten ist, wie Warburg, Kubowitz u. Christian (1930) durch Messung der Sauerstoffaufnahme und Kiese u. Weis (1943) durch Messung der Hämiglobinreduktion gefunden haben, bei den Zellen verschiedener Tiere sehr ungleich. Da die Methylenblauatmung ein Indicator für die Wirkung des Hämiglobinreduktase-Systems ist, haben wir zur Ermittlung eines geeigneten Ausgangsmaterials für die Isolierung der Hämiglobinreduktase die Steigerung der Atmung der roten Zellen verschiedener größerer Tiere

durch Methylenblau (oder Toluidinblau) gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Wegen der starken Wirkung des Toluidinblaus in roten Zellen des Menschen wurden diese zur Isolierung der Hämiglobinreduktase verwandt. Große Mengen von Menschen-Erythrocyten wurden uns von den Behring-Werken, Marburg, zur Verfügung gestellt. Die Zellen, die von gesunden Blutspendern stammten, wurden koliert und auf der Zentrifuge dreimal mit 1%iger Natriumchloridlösung gewaschen, danach eingefroren und bei —12° C aufbewahrt. In den eingefrorenen Zellen war die Hämiglobinreduktase ohne erheblichen Wirkungsverlust mehrere Wochen haltbar.

Für die Untersuchungen wurde die jeweils erforderliche Menge der eingefrorenen Erythrocyten im Wasserbad von 37° C aufgetaut und mit Wasser verdünnt.

Tabelle 1. *Sauerstoffaufnahme der roten Zellen verschiedener Tiere und deren Steigerung durch Toluidinblau*

1 ml Erythrocyten, 0,8 ml Phosphat-Ringer-Lösung[1] p_H 7,4, 0,2 ml Toluidinblau 10^{-3} Mol/l, Glucose 300 mg-%, Hämoglobinkonzentration im Ansatz 17 g/100 ml, Temperatur 37° C, Gasraum Luft

Tierart	Zahl der Versuche	Sauerstoffaufnahme μl O_2/ml Ansatz/Std ohne Toluidinblau	mit Toluidinblau
Mensch	5	3,1	78
Hund	5	4,0	44
Schaf	4	1,6	34
Rind	5	2,0	27
Kalb	2	4,8	25
Pferd	4	2,5	22
Ziege	2	1,6	15
Schwein	9	4,0	4

[1] Gemisch aus 9 Teilen einer Lösung von 8,5 g Natriumchlorid, 0,23 g Kaliumchlorid, 0,25 g Calciumchlorid in 1000 ml und 1 Teil Phosphat 0,067 Mol/l p_H 7,4.

2. Reinigung der Hämiglobinreduktase

a) Entfernung des Hämoglobins. Zur Anreicherung der in den roten Zellen in nur geringer Konzentration vorhandenen Hämiglobinreduktase war die Entfernung der großen Mengen Hämoglobin in einer einfachen Operation unerläßlich.

Durch Fraktionierung des Hämolysats mit Ammoniumsulfat war die Trennung von Hämoglobin und Ferment nicht möglich.

Durch Einwirkung von Chloroform und Alkohol auf das Hämolysat wurde Hämoglobin denaturiert und ausgefällt (Krüger 1901; Tsuchihashi 1923), die Hämiglobinreduktase aber nur zum Teil inaktiviert. Zwischenferment, von dem 2200 E in 100 ml Erythrocyten enthalten sind, wurde vollständig inaktiviert oder ausgefällt. Lösungen der Hämiglobinreduktase, die durch Denaturierung des Hämoglobins mit Chloroform und Alkohol gewonnen wurden und außer dem

Ferment noch andere Proteine enthielten (Katalase, Kohlensäureanhydrase, manchmal Spuren von Hämoglobin), wurden für alle weiteren Versuche zur Anreicherung des Ferments verwandt; sie werden im folgenden als Wasser-Chloroform-Alkohol-Lösungen (WCA-Lösungen) bezeichnet.

b) Fraktionierte Fällung. Versuche zur Trennung der Proteine in der WCA-Lösung durch fraktionierte Fällung mit Alkohol oder mit Aceton waren ohne Erfolg. Die Anwendung der organischen Lösungsmittel in saurer, neutraler oder alkalischer Lösung bewirkte einen starken Verlust an Ferment und erzielte für den noch aktiven Rest keine Anreicherung. Vorherige Dialyse der WCA-Lösung zur Entfernung des Chloroforms verbesserte das Ergebnis nicht.

Eine Anreicherung der Hämiglobinreduktase gelang jedoch durch fraktioniertes Aussalzen von Proteinen mit Ammoniumsulfat. Die WCA-Lösungen wurden zur Entfernung von Alkohol und Chloroform gegen destilliertes Wasser in Zellophanschläuchen dialysiert und danach in den gleichen Schläuchen im Kühlraum durch Anblasen mit Luft eingeengt bis die Proteinkonzentration 0,5—1,0 g/100 ml betrug. Durch Zusatz von Ammoniumsulfat bis zum Sättigungsgrad 0,5 wurde nur sehr wenig inaktives Protein gefällt. Erhöhung des Sättigungsgrades auf 0,6 bewirkte die Abtrennung von etwa 75% der Fermentmenge mit einer Anreicherung auf das 4fache. Die Wiederholung der Fraktionierung des Ferments mit Ammoniumsulfat führte meist nicht zu einer weiteren Reinigung.

c) Adsorptionen. Cellulose adsorbierte die Hämiglobinreduktase gar nicht und Silica-Gel nur sehr schwach. An Aluminiumhydroxyd wurde das Ferment in Abwesenheit von Phosphat sehr fest gebunden. Durch Zusatz von Dinatriumphosphat wurde die Bindung so verändert, daß das Ferment durch alkalische Ammoniumsulfatlösung wieder eluiert werden konnte. Jedoch wurden Reinigungen dabei nicht erzielt.

Aluminiumoxydsäulen (Merck, nach Brockmann) gewaschen mit 0,1 mol Phosphatlösung p_H 5,7, adsorbierten die Hämiglobinreduktase aber nicht Katalase aus der gleichen Phosphatlösung. Durch 0,1 mol Dinatriumphosphat wurde etwa ein Zehntel der adsorbierten Fermentmenge eluiert, sobald die durchlaufende Lösung das p_H 7,6 erreicht hatte. Das wiedergewonnene Ferment hatte den etwa 5fachen Reinheitsgrad des eingesetzten. Als regelmäßige Operation im Reinigungsverfahren wurde die Adsorption an Aluminiumoxyd trotzdem nicht angewandt, siehe unten.

Elution mit guter Ausbeute gelang nach Adsorption des Ferments an Tricalciumphosphat-Gel. Aus 0,1%iger Natriumchloridlösung von p_H 6—7 wurde das Ferment vollständig adsorbiert. Das Gel wurde mit 0,2 mol Mononatriumphosphatlösung gewaschen zur Entfernung inaktiver Proteine. Ferment von 2—3facher Aktivität wurde dann mit 0,2 mol Phosphatlösung p_H 6,8 eluiert. Mehrmals wurde nach Adsorption und Elution eine größere Steigerung der Fermentaktivität beobachtet als der Entfernung von inaktivem Protein entsprach. Durch die Adsorption wurden wahrscheinlich Hemmstoffe entfernt.

Verfahren zur Reinigung der Hämiglobinreduktase

Zur Anreicherung der Hämiglobinreduktase auf das 500—1000fache ihres Reinheitsgrades im Menschenerythrocyten wurde das unten beschriebene Verfahren angewandt. Die Anordnung der Operationen, die eine Anreicherung ermöglichen, ergab sich aus der Erfahrung, daß zur fraktionierten Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat eine Proteinkonzentration von mindestens 0,25 g/100 ml erforderlich ist, organische Lösungsmittel entfernt sein müssen, und daß das Ferment nach Anreicherung bei der Dialyse Aktivität verliert.

Aus der WCA-Lösung konnte das Ferment ohne Entfernung von Alkohol und Chloroform an Calciumphosphat-Gel adsorbiert und von dem Adsorbens in einer Konzentration von etwa 0,3 g Protein je 100 ml Lösung eluiert werden. Durch Fraktionierung dieser Lösung mit Ammoniumsulfat wurden Präparate von 40—60 E-Hämiglobinreduktase je Milligramm Protein erhalten gegenüber 0,1—0,15 E je Milligramm Protein im Erythrocyten.

Verfahren. Im V2a-Zentrifugenbecher (1350 ml) wurden 150 ml gewaschene, eingefrorene und wieder aufgetaute rote Zellen von Menschen mit 165 ml Wasser von 0° C gemischt und mit 100 ml Chloroform und 75 ml Äthanol im Kältebad von —10° C von einem großen Homogenator durchmischt bis der Ansatz zu einem Brei erstarrte. 6 solcher Ansätze wurden auf der 8 l-Zentrifuge 20 min zentrifugiert. Die überstehende schwach trübe WCA-Lösung wurde filtriert: etwa 1200 ml leicht gelb gefärbte WCA-Lösung (p_H 6—7) mit 0,1 bis 0,15% Protein.

Nach Zusatz von 1 g Natriumchlorid je Liter WCA-Lösung wurde diese zur Adsorption des Ferments zweimal mit je 100 ml Calciumphosphat-Gel verrührt. Das Gel wurde auf der Zentrifuge abgetrennt, zur Elution inaktiver Proteine zweimal mit je 100 ml 0,2 mol Mononatriumphosphatlösung gewaschen und auf der Zentrifuge von der sauren Phosphatlösung abgetrennt. Zur Elution des Ferments aus dem Gel wurde dieses 3—4mal mit je 100 ml 0,2 mol Phosphatlösung p_H 6,8 20 min lang gerührt und auf der Zentrifuge abgetrennt. Der Proteingehalt der Lösung betrug etwa 0,25 g/100 ml.

Das Eluat wurde bis zum Sättigungsgrad 0,5 mit Ammoniumsulfat versetzt. Ein kleiner Niederschlag, der wenig Ferment enthielt, wurde abzentrifugiert. Durch Erhöhung des Sättigungsgrades auf 0,6 wurden etwa 70% der Fermentmenge durch Ammoniumsulfat ausgefällt. Nach 4 Std wurde der Niederschlag mit dem Ferment abzentrifugiert und in 0,2 mol Phosphat p_H 6,8 aufgenommen. Die Lösung wurde hochtourig zentrifugiert, wenn sie unlösliche Teile enthielt.

Die Zunahme des Reinheitsgrades durch die einzelnen Reinigungsoperationen und die Ausbeuten sind in Tab. 2 angegeben.

Tabelle 2. *Reinigung der Hämiglobinreduktase aus Menschenerythrocyten*

Stufe der Präparation	Reinigungsschritt	Hämiglobin-reduktasegehalt E/mg Protein	Ausbeute %
1. Hämolysat		0,14	100
	Hämoglobindenaturierung		
2. WCA-Lösung		6	60
	Adsorption an Calcium-phosphat-Gel		
3. Eluat		18	24
	Fraktionierung mit Ammoniumsulfat		
4. Fällung beim Sättigungsgrad 0,6		60	16
	Adsorption an Aluminiumoxyd		
5. Eluat		150	1

Die Anreicherung des Ferments auf 60 E/mg Protein nach dem dritten Reinigungsschritt wurde nicht immer erreicht. Bei der Mehrzahl der Präparate betrug die Aktivität auf dieser Stufe 40—60 E/mg Protein.

Für die Untersuchung der Eigenschaften der Reduktase wurden diese Präparate verwandt. Eine weitere Reinigung durch Adsorption an der Aluminiumoxydsäule wurde mit den meisten Präparaten nicht durchgeführt, weil die Ausbeuten sehr schlecht waren. Vor der Adsorption mußten die Präparate gegen 0,1 mol Phosphatlösung p_H 5,7 dialysiert werden. Dabei wurden wechselnde Mengen — bis zur Hälfte der Fermentmenge — inaktiviert. Die etwa 4fache Anreicherung an Fermentaktivität, die durch die Aluminiumoxydsäule erreicht werden konnte, wurde dadurch in ihrer Auswirkung auf die Erhöhung des Reinheitsgrades des Ferments beeinträchtigt (s. Tab. 2).

Eigenschaften

1. Beständigkeit

Präparate der Stufe 4 (s. Tab. 2) verloren in 0,2 mol Phosphatlösung p_H 6,8 im Kühlraum im Laufe von 2 Wochen 10—30% ihrer Aktivität. Nach Gefriertrocknung dieser Lösung waren die Präparate inaktiv.

Durch Erwärmen der Lösung des Ferments auf 60° C wurde es innerhalb 1 min inaktiviert.

2. Zusammensetzung der Präparate

Die Hämiglobinreduktasepräparate der Präparationsstufe 4 (s. Tab. 2) enthielten noch größere Mengen Katalase, die durch ihr Spektrum und ihre Wirkung nachgewiesen wurden. Durch die Adsorption an Aluminiumoxyd wurde Katalase weitgehend entfernt.

Durch Papierelektrophorese mit verschiedenen Puffern von p_H 5,7 bis p_H 8,6 war eine klare Auftrennung der Proteine nicht möglich. Die Elektrophorese im Gerät von Antweiler in 0,1 mol Phosphat p_H 7,5 ergab zwei mit nur wenig verschiedener Geschwindigkeit zur Anode wandernde Proteine.

3. Flavingehalt

In Präparaten der Stufe 4 war wegen der Anwesenheit der Katalase eine Bestimmung des Flavingehalts aus dem Absorptionsspektrum nicht möglich, und Präparate der Stufe 5 wurden in zu geringer Menge erhalten. Darum wurde der Gehalt an Flavin in Präparaten der Stufe 4 nach dessen Abspaltung bestimmt.

Die Lösung des Ferments wurde bei 2° C mit 18 g Ammoniumsulfat je 100 ml versetzt, mit Salzsäure auf etwa p_H 2 angesäuert und die Ammoniumsulfatkonzentration auf 50 g/100 ml erhöht. Der Niederschlag wurde durch hochtouriges Zentrifugieren in der Kälte abgetrennt.

Für die papierchromatographische Untersuchung der abgespaltenen Flavinderivate wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren sofort mit Dinatriumphosphat versetzt und mit wenigen Millilitern Cresolum liquefactum ausgezogen. Das Kresol wurde mit der doppelten Menge Äther versetzt. Diesem Gemisch wurden die Flavine durch mehrmaliges Durchschütteln mit je 1 ml Wasser entzogen. Die im Vakuum eingeengte wäßrige Lösung wurde zur Papierchromatographie nach Crammer (1948) verwandt.

Im Papierchromatogramm wanderte fast die gesamte Menge gelber fluorescierender Substanz mit dem R_f-Wert des Flavinadenindinucleotids. Nur in Spuren waren schneller wandernde grüngelb fluorescierende Substanzen mit den R_f-Werten des Flavinmononucleotids und des Riboflavins vorhanden. Wahrscheinlich lag das aus den Fermentpräparaten abgespaltene Flavin in diesen als Flavinadenindinucleotid vor, und die kleinen Mengen der anderen Verbindungen entstanden bei der Aufarbeitung.

Für die Bestimmung des Flavingehalts durch Messung der Fluorescenz blieb der nach Ansäuern der Fermentlösung, Aussalzen der Proteine und Zentrifugieren erhaltene Überstand bei Zimmertemperatur zur Hydrolyse des Flavinnucleotids stehen, und das gesamte Flavin wurde in Form des stark fluorescierenden Riboflavins gemessen.

In 10000 E Hämiglobinreduktase waren im Mittel 9 γ FAD enthalten.

Wenn das in den Fermentpräparaten nachgewiesene und bestimmte FAD die Wirkungsgruppe der Hämiglobinreduktase ist, dann ergibt sich für das Ferment unter den Bedingungen unseres Testes eine sehr schnelle Reaktion mit Methylenblau und eine Wechselzahl von etwa 10000/min. Das Ferment ist dann ebenso wirksam wie Diaphorase aus Herzmuskel (Straub 1939; Corran, Green u. Straub 1939; Adler, v. Euler u. Günther 1939). In der Hämiglobinreduktase wären nur 20—30% des im Erythrocyten vorhandenen FAD enthalten. Buch, Bessey u. Lowry (1948) bestimmten den Gehalt der roten Zellen des Menschen an FAD zu 22,4 γ Riboflavin je 100 ml Zellen.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß Hämiglobinreduktase ein gelbes Ferment ist, wurde bisher nicht gefunden. Weder frische Fermentpräparate noch solche, die durch Dialyse Aktivität verloren hatten, wurden durch Zugabe von FAD und FMN aktiviert.

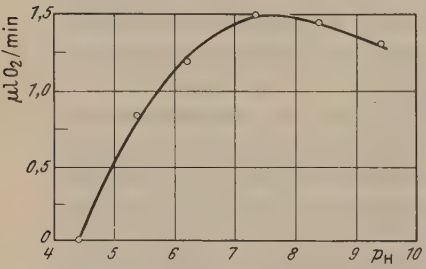


Abb. 3. Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme des Hämiglobinreduktasesystems mit Methylenblau von der Wasserstoffionenkonzentration. 10 E Hämiglobinreduktase je Ansatz. Puffer 0,05 mol: p_H 4,4 u. 5,4 Bernsteinsäure; p_H 6,2 u. 7,4 Triäthanolamin; p_H 8,4 u. 9,4 Veronal. Temperatur 37° C (s. a. S. 161)

4. Wirkungen

Durch Sauerstoff wurde Hämiglobinreduktase nicht oxydiert. Mit Methylenblau reagierte sie schnell. Durch Erhöhung der Methylenblaukonzentration über 10^{-4} Mol · l^{-1} wurde die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme im System Zwischenferment-TPN-Hämiglobinreduktase nicht weiter gesteigert. Die Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch Methylenblau im intakten Erythrocyten erreicht bei der gleichen Konzentration ihr Maximum.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Hämiglobinreduktasekonzentration bei konstanter Konzentration von Methylenblau, TPN und Zwischenferment ist aus der Eichkurve Abb. 2 (S. 162) zu ersehen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist in dem untersuchten Konzentrationsbereich dem Logarithmus der Reduktase-Konzentration proportional.

Die Reduktion von Nitrosobenzol ist in der Abb. 1 (S. 159) beschrieben. Die Kinetik der Reaktion der Hämiglobinreduktase mit Nitrosobenzol ist in der folgenden Arbeit [Kiese, Resag u. Schneider (1957)] genauer untersucht.

Hämiglobin wurde durch die Fermentpräparate der Präparationsstufe 4 nicht reduziert, ebenso nicht Cytochrom c. Zugabe von FAD und FMN aktivierten das Ferment nicht zur Hämiglobinreduktion.

5. Einfluß von Wasserstoffionen auf das Hämiglobinreduktase-System

Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme des Systems Glucose-6-phosphat-Zwischenferment-TPN-Hämiglobinreduktase-Methylenblau wurde unter Verwendung von Bernsteinsäure, Triäthanolamin und Veronal als Puffer im Bereich von p_H 4,4—9,4 gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 zusammengestellt und ergeben für die Wirkung des ganzen Systems ein p_H-Optimum zwischen p_H 7 und p_H 8.

Zusammenfassung

Hämiglobinreduktase aus roten Zellen des Menschen wurde auf den 1000fachen Reinheitsgrad des Ausgangsmaterials angereichert.

Gereinigte Hämiglobinreduktase reduzierte Methylenblau und Nitrosobenzol wie das Ferment in den roten Zellen. Mit ihr konnte der im Erythrocyten ablaufende enzymische Kreisprozeß der Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin mit isolierten Fermenten durchgeführt werden.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Adler, E., H. v. Euler and G. Günther: Nature (Lond.) **143**, 641 (1939). — Burch, H. B., O. A. Bessey and O. H. Lowry: J. of Biol. Chem. **175**, 457 (1948). — Corran, H. S., D. E. Green and F. B. Straub: Biochemic. J. **33**, 793 (1939). — Crammer, J. C.: Nature (Lond.) **161**, 349 (1948). — Dimant, E., D. R. Sanadi and F. M. Huennekens: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 5440 (1952). — Foulkes, E. C.: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **29**, 9 (1951). — Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David: J. of Biol. Chem. **177**, 751 (1948). — Huennekens, F. M., and B. W. Gabrio: Federat. Proc. **13**, 232 (1954). — Keilin, D., and E. F. Hartree: Proc. Roy. Soc. (Lond.) B **124**, 397 (1938). — Kiese, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 99 (1949). — Kiese, M., D. Reinwein u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 393 (1950). — Kiese, M., K. Resag u. Cl. Schneider: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 170 (1957). — Kiese, M., u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 345 (1950). — Kiese, M., u. B. Weis: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 493 (1943). — Kornberg, A., and B. L. Horecker: Biochemical Preparations **3**, 24 (1953). — Krüger, F.: Z. Biol. **41**, 341 (1901). — Straub, F. B.: Biochemic. J. **33**, 787 (1939). — Theorell, H.: Biochem. Z. **278**, 263 (1935). — Tsuchihashi, M.: Biochem. Z. **140**, 63 (1923). — Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **254**, 438 (1932). — Warburg, O., W. Christian u. A. Griese: Biochem. Z. **298**, 150 (1938). — Warburg, O., F. Kubowitz u. W. Christian: Biochem. Z. **221**, 494 (1930); **227**, 245 (1930). — Weygand, F., u. L. Birkofer: Z. physiol. Chem. **261**, 172 (1939). — Weygand, F., u. H. Stocker: Z. physiol. Chem. **247**, 167 (1937).

Professor Dr. M. Kiese, Pharmakologisches Institut Tübingen/Neckar

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 170—175 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg

Reduktion von Nitrosobenzol durch Hämiglobinreduktase und durch altes gelbes Ferment*

Von

M. Kiese, K. Resag und Cl. Schneider

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Februar 1957)

Die Reduktion des Nitrosobenzols durch isolierte Hämiglobinreduktase, die bei Gegenwart von Hämoglobin und Sauerstoff den Kreisprozeß der Hämiglobinbildung im Erythrocyten zu reproduzieren ermöglicht (Kiese, Schneider u. Waller 1957), haben wir genauer untersucht und mit der Reduktion des Nitrosobenzols durch altes gelbes Ferment aus Hefe verglichen.

Die Reaktion wurde unter ähnlichen Bedingungen gemessen wie sie im Erythrocyten abläuft, d. h. insbesondere in Gegenwart von Hämoglobin und Sauerstoff. Dadurch war in der Hämiglobinbildung ein einfacher Indicator für die Reduktion des Nitrosobenzols gegeben, der notwendig war, aber die Analyse der Reaktion beeinträchtigte. Bei Gegenwart von Hämoglobin im Versuchsansatz wird ein Teil des Nitrosobenzols an Hämoglobin gebunden unter Bildung von Nitrosobenzol-Hämoglobin. Bisher ist nicht bekannt, ob Hämiglobinreduktase und altes gelbes Ferment nur freies Nitrosobenzol reduzieren oder auch mit gleicher oder anderer Geschwindigkeit das an Hämoglobin gebundene.

Bei konstanter Konzentration der Fermente und des Hämoglobins war die Geschwindigkeit der Reduktion von Nitrosobenzol wie im Erythrocyten $[\text{Nitrosobenzol}]^{0,4}$ proportional (Kiese, Reinwein u. Waller 1950).

Ebenso wie die Reduktion von Methylenblau durch Hämiglobinreduktase (Kiese, Schneider, Waller 1957) war bei konstanter Konzentration von Zwischenferment, TPN und Nitrosobenzol die Geschwindigkeit der Reduktion des Nitrosobenzols dem Logarithmus der Konzentration der Hämiglobinreduktase proportional.

Nitrosobenzol wurde von der Hämiglobinreduktase schneller reduziert als Methylenblau. In die vergleichende Berechnung kann nur das gesamte zugegebene Nitrosobenzol eingesetzt werden. Wenn nur das

* Kinetik der Hämiglobinbildung XV.

freie oder das an Hämoglobin gebundene Nitrosobenzol mit Hämiglobinreduktase reagieren, dann ist der Unterschied noch größer. Bei niedrigen Konzentrationen von Phenylhydroxylamin, wie sie unter den gegebenen Bedingungen in Frage kommen, wird bei der gekoppelten Oxydation von Hämoglobin und Phenylhydroxylamin durch Sauerstoff je Mol Phenylhydroxylamin ein Äquivalent Hämiglobin gebildet (Kiese u. Reinwein 1950). Für die Bildung eines Äquivalentes Hämiglobin wird dementsprechend die Reduktion von einem Mol Nitrosobenzol angenommen.

Bei der in unseren Versuchen gegebenen Konzentration von Zwischenferment, TPN und Glucose-6-phosphat, 10^{-4} Mol Nitrosobenzol und 15000 E Hämiglobinreduktase je Liter betrug die Geschwindigkeit der Reduktion von Nitrosobenzol $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ Mol $\cdot$ $l^{-1} \cdot min^{-1}$. Aus den Daten von Kiese, Schneider u. Waller (1957) ergibt sich für die Reduktion von Methylenblau durch Hämiglobinreduktase bei gleicher Konzentration der Fermente und 10^{-4} Mol Methylenblau je Liter die Geschwindigkeit 10^{-4} Mol $\cdot$ $l^{-1} \cdot min^{-1}$. Der gleiche Unterschied der Reaktionsgeschwindigkeit von Nitrosobenzol und Methylenblau wurde in Erythrocyten bei Messung der durch Nitrosobenzol und Methylenblau bewirkten Steigerung der Sauerstoffaufnahme gefunden (Kiese u. Waller 1950).

Isolierte Hämiglobinreduktase reduzierte Nitrosobenzol ebenso schnell wie das Ferment in roten Zellen. Die roten Zellen des Menschen enthalten 45 E Hämiglobinreduktase je Milliliter. Für Zellsuspensionen mit 15 g Hämoglobin je 100 ml fanden Kiese u. Waller (1950) bei Einwirkung von 10^{-4} Mol Nitrosobenzol je Liter eine Anfangsgeschwindigkeit der Hämiglobinbildung von 0,27 g Hämiglobin/100 ml/min. Unverdünnte Erythrocyten mit 45 E Hämiglobinreduktase je Milliliter bildeten dann 0,54 g Hämiglobin/100 ml/min. Isolierte Hämiglobinreduktase in gleicher Konzentration bildete mit der gleichen Nitrosobenzolkonzentration 0,5 g Hämiglobin/100 ml/min.

Durch altes gelbes Ferment wurde Nitrosobenzol ebenfalls reduziert, jedoch war seine Wirkung schwächer als die der Hämiglobinreduktase. Bei gleicher Konzentration von Zwischenferment, TPN und Nitrosobenzol reduzierten 10^{-5} Mol altes gelbes Ferment je Liter und 13000 E Hämiglobinreduktase je Liter das Nitrosobenzol gleich schnell. Unsere am stärksten wirksamen Präparate der Hämiglobinreduktase enthielten 150 E je Milligramm Protein (Kiese, Schneider u. Waller 1957). Wenn man annimmt, daß diese Präparate rein waren, und daß Hämiglobinreduktase ein Molekulargewicht von etwa 100000 hat, dann reduzierten $2 \cdot 10^{-6}$ Mol Hämiglobinreduktase Nitrosobenzol ebenso schnell wie 10^{-5} Mol altes gelbes Ferment je Liter. Der Unterschied der Wirkungsstärke zwischen Hämiglobinreduktase und altem gelben

Ferment ist jedoch noch größer, weil die Hämiglobinreduktasepräparate mit 150 E je Milligramm noch unwirksame Proteine enthielten.

Verschieden war in der Reaktion von altem gelben Ferment und von Hämiglobinreduktase mit Nitrosobenzol auch der Einfluß der Nitrosobenzolkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Unterschiede in der Geschwindigkeit der Reaktion der Fermente mit dem hydrierten TPN können diese Abweichungen bedingen.

Altes gelbes Ferment reduzierte Nitrosobenzol schneller als Sauerstoff. Bei der gegebenen Konzentration von Zwischenferment und TPN reduzierten 10^{-5} Mol altes gelbes Ferment je Liter unter Luft, also bei einer Sauerstoffkonzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol $\cdot l^{-1}$, $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ Äquivalent $O_2 \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$ (Kiese, Schneider u. Waller 1957). Unter gleichen Bedingungen und der Nitrosobenzolkonzentration von 10^{-4} Mol $\cdot l^{-1}$ wurde Nitrosobenzol mit der Geschwindigkeit von $2{,}7 \cdot 10^{-4}$ Äquivalent $\cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$ reduziert.

Methoden

Die angewandten Verfahren zur Darstellung von Enzymen, Triphosphopyridinnucleotid (TPN) und Hexose-6-phosphat sowie die analytischen Methoden sind bei Kiese, Schneider u. Waller (1957) beschrieben. Die Hämiglobinreduktase-Präparate waren bis zur 4. Stufe (Aktivität 40—60 E/mg Protein) gereinigt.

Hämoglobinlösungen, aus denen Zwischenferment und Hämiglobinreduktase entfernt waren, wurden aus hämolysierten Hunde-Erythrocyten gewonnen. Mit 1%iger Natriumchloridlösung mehrmals gewaschene Zellen wurden mit 2 Teilen Wasser zur Hämolyse versetzt. Zur Adsorption der Fermente wurde etwa $^1/_3$Vol. Aluminiumhydroxyd γ (Willstätter u. Kraut 1923, 1924) zugesetzt und 45 min mit der Lösung verrührt. Nach Abtrennung des Aluminiumhydroxyds auf der Zentrifuge wurde die Hämoglobinlösung durch Zugabe von Hexose-6-phosphat, TPN und altem gelben Ferment auf Zwischenferment und durch Zugabe von Hexose-6-phosphat, TPN, Zwischenferment und Methylenblau auf Hämiglobinreduktase geprüft. Waren noch meßbare Konzentrationen der Fermente in der Lösung vorhanden, so wurde die Adsorption wiederholt. Aus Hämolysaten der roten Zellen vom Hunde waren die Fermente leichter vollständig zu adsorbieren als aus den Hämolysaten von Menschenzellen. Durch die Verdünnung und durch die Adsorption eines Teiles des Hämoglobins an das Aluminiumhydroxyd war die Hämoglobinkonzentration soweit vermindert, daß die Lösungen im Kühlraum in Zellophanschläuchen durch Anblasen mit Luft eingeengt werden mußten.

Phenylhydroxylamin wurde teils nach Bamberger (1890) und Wohl (1890), teils nach Utzinger (1944) dargestellt. Nitrosobenzol wurde aus Phenylhydroxylamin durch Oxydation mit Chromsäure erhalten.

Wegen seiner geringen Löslichkeit in Wasser wurde Nitrosobenzol für die Versuche in Aceton gelöst. Unmittelbar vor der Zugabe zum Versuchsansatz wurde die Lösung mit 9 Teilen 0,9%iger Natriumchloridlösung verdünnt. Im Versuchsansatz von 2 ml waren 0,2 ml dieser Lösung enthalten, so daß sein Acetongehalt 1% betrug.

Die Geschwindigkeit der enzymischen Reduktion von Nitrosobenzol wurde wegen dessen geringer Konzentration nicht durch Bestimmung des Nitrosobenzols selbst gemessen. Vielmehr wurde die Hämiglobinbildung, die durch das entstehende Phenylhydroxylamin in Anwesenheit von Hämoglobin und Sauerstoff bewirkt wurde, gemessen. Dadurch wurde Phenylhydroxylamin wieder zu

Nitrosobenzol oxydiert, und dessen Konzentration nahm nur langsam durch Nebenreaktionen ab. Da die Reaktion von Phenylhydroxylamin, Hämoglobin und Sauerstoff zu Hämiglobin und Nitrosobenzol schnell verläuft im Vergleich zur enzymischen Reduktion des Nitrosobenzols (Kiese u. Reinwein 1950) ist die Reduktion des Nitrosobenzols geschwindigkeitsbestimmend für die Hämiglobinbildung.

Die Versuchsansätze hatten folgende Zusammensetzung: Hexose-6-phosphat 5 mg, TPN-Präparat 3 mg, Zwischenferment 1 E, Dinatriumäthylendiamintetraacetat $2 \cdot 10^{-6}$ Mole, Triäthanolamin-HCl-Puffer (0,1 mol p_H 7,4) 0,2 ml, Hämoglobinlösung 1 ml, Nitrosobenzollösung 0,2 ml, Hämiglobinreduktase bzw. altes gelbes Ferment, Wasser ad 2,0 ml.

Die Ansätze wurden in Kolben von 25 ml Inhalt im Wasserbad von 37° C langsam geschüttelt. Der Gasraum wurde fortlaufend langsam mit Luft, die bei 37° C mit Wasserdampf gesättigt war, durchspült.

Versuche

1. Reduktion von Nitrosobenzol durch Hämiglobinreduktase

Zum Vergleich mit der Wirkung der isolierten Hämiglobinreduktase wurde die Nitrosobenzolreduktion durch Hämiglobinreduktase im Hämolysat gemessen. Den Hämolysaten wurde Hexose-6-phosphat und TPN in der gleichen Menge zugesetzt wie den Versuchsansätzen, die gereinigte Hämiglobinreduktase enthielten.

Unterschiede im Ablauf der Reaktion waren nicht vorhanden. Auch die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Nitrosobenzolkonzentration war gleich.

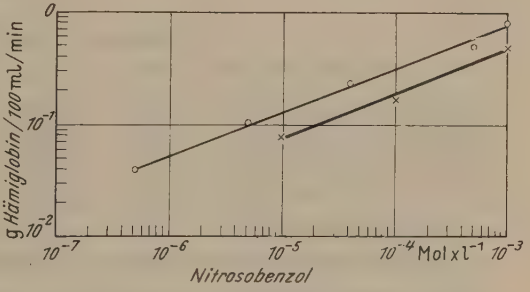


Abb. 1. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reduktion von Nitrosobenzol durch Hämiglobinreduktase von der Nitrosobenzol-Konzentration. o—o gereinigte Hämiglobinreduktase 16 E/ml; ×—× hämolysierte rote Zellen des Hundes. Hämoglobinkonzentration 13—15 g/100 ml. Temp. 37° C. Die Marken sind Mittel aus 3 Messungen

Nach Zugabe von Nitrosobenzol begann sofort die Hämiglobinbildung mit einer von der Nitrosobenzolkonzentration abhängigen Geschwindigkeit. Schneller als im intakten Erythrocyten (Kiese, Reinwein u. Waller 1950) verlangsamte die Reaktion mit der Zeit. Nach 40 min wurde sie weder durch Zusatz von Hexose-6-phosphat noch durch Zusatz von TPN beschleunigt; auch Zusatz von Hämiglobinreduktase beschleunigte die Reaktion dann nur wenig. Durch Zugabe von Zwischenferment erreichte die Reaktion wieder die Anfangsgeschwindigkeit. Demnach wurde in den Ansätzen das Zwischenferment durch Nitrosobenzol oder Phenylhydroxylamin oder andere Umsetzungsprodukte des Nitrosobenzols inaktiviert. Allen Angaben über die Reaktionsgeschwindigkeit liegt die Anfangsgeschwindigkeit zugrunde.

Bei konstanter Konzentration der gereinigten Hämiglobinreduktase (16 E/ml Ansatz) war die Geschwindigkeit der Reduktion des Nitrosobenzols dessen Konzentration nicht proportional. Wie im intakten Erythrocyten (Kiese, Reinwein u. Waller 1950) war die Geschwindigkeit [Nitrosobenzol] ^{0,4} proportional (Abb. 1).

Der Einfluß der Hämiglobinreduktase-Konzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde für Konzentrationen von 5—30 E je Milliliter gemessen. Die Geschwindigkeit der Reduktion des Nitrosobenzols war in diesem Bereich dem Logarithmus der Hämiglobinreduktase-Konzentration proportional (Abb. 2).

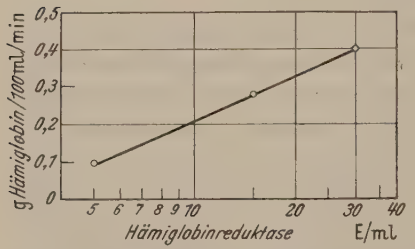


Abb. 2. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reduktion des Nitrosobenzols von der Hämiglobinreduktase-Konzentration. Zusammensetzung der Ansätze s. S. 173. Nitrosobenzol 10^{-4} Mol · l^{-1}. Hämoglobinkonzentration 13 bis 15 g/100 ml. Temp. 37° C. Die Marken sind Mittel aus 3 Messungen

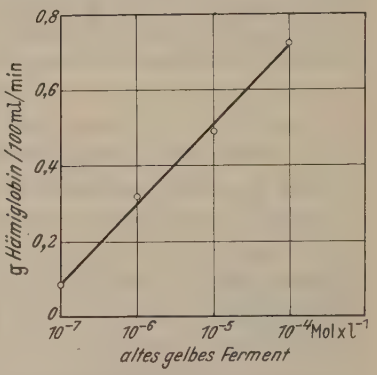


Abb. 3. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reduktion des Nitrosobenzols von der Konzentration des alten gelben Ferments. Zusammensetzung der Ansätze s. S. 173. Nitrosobenzol 10^{-3} Mol · l^{-1}. Hämoglobin 13—15 g/100 ml. Temp. 37° C. Die Marken sind Mittel aus 3 Messungen

2. Reduktion von Nitrosobenzol durch altes gelbes Ferment

Die Geschwindigkeit der Reduktion von Nitrosobenzol durch altes gelbes Ferment war von 10^{-7} bis 10^{-4} Mol gelbes Ferment je Liter dem Logarithmus der Konzentration des Ferments proportional (Abb. 3). Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Fermentkonzentration war aber geringer als bei der Hämiglobinreduktase. Während die Erhöhung der Konzentration an Hämiglobinreduktase auf den 10fachen Wert die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung um 0,4 g Hb^{III}/100 ml/min erhöhte, nahm die Reaktionsgeschwindigkeit bei der gleichen Erhöhung der Konzentration des gelben Ferments nur um 0,15 g Hb^{III}/100 ml/min zu.

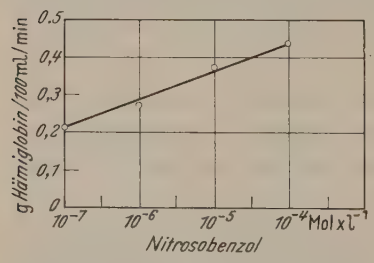


Abb. 4. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reduktion von Nitrosobenzol durch altes gelbes Ferment von der Nitrosobenzolkonzentration. Zusammensetzung der Ansätze s. S. 173. Altes gelbes Ferment 10^{-5} Mol · l^{-1}. Hämoglobin 13—15 g/100 ml. Temp. 37° C. Die Marken sind Mittel aus 3 Messungen

Die Konzentration des Nitrosobenzols beeinflußte dessen Reaktion mit dem alten gelben Ferment in anderer Weise als die Reaktion mit Hämiglobinreduktase. Bei der Konzentration des gelben Ferments von 10^{-5} Mol $\cdot$ l^{-1} war die Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-4} Mol Nitrosobenzol je Liter dem Logarithmus der Nitrosobenzolkonzentration proportional (Abb. 4).

3. Reduktion von Nitrobenzol durch Hämiglobinreduktase und durch altes gelbes Ferment

Beide Fermente reduzierten Nitrobenzol, aber viel langsamer als Nitrosobenzol. Gemessen an der Hämiglobinbildung durch das bei der Reduktion gebildete Phenylhydroxylamin betrug die Reaktionsgeschwindigkeit nur $^1/_{30}$ bis $^1/_{20}$ der des Nitrosobenzols. Durch 10^{-4} Mol Nitrobenzol je Liter wurden von 10^{-5} Mol $\cdot$ l^{-1} altem gelben Ferment 0,03 g Hämiglobin/100 ml/min gebildet und durch 16 E Hämiglobinreduktase je Milliliter 0,015 g Hämiglobin/100 ml/min. Die gleichen Fermentkonzentrationen bildeten mit 10^{-4} Mol Nitrosobenzol je Liter 0,4 bzw. 0,3 g Hämiglobin/100 ml/min.

Zusammenfassung

Gereinigte Hämiglobinreduktase aus roten Zellen des Menschen reduzierte Nitrosobenzol ebenso schnell wie das Ferment in roten Zellen. Die Nitrosobenzolkonzentration beeinflußte die Reaktionsgeschwindigkeit in gleicher Weise wie im Erythrocyten. Nitrosobenzol wurde von Hämiglobinreduktase schneller reduziert als Methylenblau.

Altes gelbes Ferment aus Hefe reagierte mit Nitrosobenzol langsamer als Hämiglobinreduktase. Es reduzierte Nitrosobenzol jedoch schneller als Sauerstoff.

Nitrobenzol wurde von Hämiglobinreduktase und von altem gelben Ferment langsamer reduziert als Nitrosobenzol.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Bamberger, E.: Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 1347 (1890). — Kiese, M., u. D. Reinwein: Arch exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 392 (1950). — Kiese, M., D. Reinwein u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 393 (1950). — Kiese, M., Cl. Schneider u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 158 (1957). — Kiese, M., u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 345 (1950). — Utzinger, G. E.: Liebigs Ann. **556**, 50 (1944). — Willstätter, R., u. H. Kraut: Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 1118 (1923); **57**, 1088 (1924). — Wohl, A.: Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 1432 (1890).

Prof. Dr. M. Kiese, Pharmakologisches Institut, Tübingen/Neckar

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 176—178 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg

Reduktion von Hämiglobin durch altes gelbes Ferment*

Von
M. Kiese, K. Resag und Cl. Schneider

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Februar 1957)

Die enzymische Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen ist eingehend untersucht und die Beteiligung verschiedener Fermentsysteme an dieser Reaktion erwiesen worden. Bisher ist noch keins der im Erythrocyten mit Hämiglobin reagierenden Fermente isoliert worden. Wir haben Hämiglobinreduktase, das Ferment aus Erythrocyten, das die katalytische Beschleunigung der Hämiglobinreduktion durch Methylenblau und andere Farbstoffe ermöglicht, stark angereichert (Kiese, Schneider u. Waller 1957). Während frühere Untersuchungen (Kiese 1944, 1949) die Reaktion eines durch hydriertes Triphosphopyridinnucleotid (TPN) reduzierbaren Ferments mit Hämiglobin erwiesen und Hämiglobinreduktase als dies Ferment angenommen wurde, reagierte isolierte Hämiglobinreduktase nicht mit Hämiglobin.

Wir haben deshalb als Modell einer enzymischen Hämiglobinreduktion durch isolierte Fermente zunächst die Reduktion von Hämiglobin durch altes gelbes Ferment aus Hefe untersucht.

Davenport, Hill u. Whatley (1952) haben in Pflanzenblättern einen durch Aceton und Ammoniumsulfat fällbaren, nicht dialysablen und durch Erhitzen inaktivierbaren Faktor gefunden, der Hämiglobin reduzierte.

Altman (1954) gewann aus Cytochrom-c-Reduktasepräparaten, die nach Haas, Harrer u. Hogness (1942) aus Bäckerhefe dargestellt waren, durch Behandlung mit Acetatlösung p_H 4,8 ein Ferment, das mit hydriertem Triphosphopyridinnucleotid reagierte und Hämiglobin reduzierte.

Methoden

Die in dieser Untersuchung benutzten Präparate von Hexose-6-phosphat, Zwischenferment, TPN und altem gelben Ferment sind bei Kiese, Schneider u. Waller (1957), die in den Versuchsansätzen enthaltenen Konzentrationen an Hexose-6-phosphat, TPN, Zwischenferment, Äthylendiamintetraessigsäure und Triäthanolamin bei Kiese, Resag u. Schneider (1957) beschrieben. Fermentfreies Hämiglobin wurde aus Hundeerythrocyten durch Einwirkung von Nitrit, Waschen mit 1%iger Natriumchloridlösung, Hämolyse und Behandlung mit Aluminiumhydroxyd gewonnen (Kiese, Resag u. Schneider 1957).

* Die Reduktion des Hämiglobins VIII.

Die Hämiglobinreduktion verlief unter Ausschluß von Sauerstoff in Kohlenoxydatmosphäre. Ihre Geschwindigkeit wurde teils optisch durch Probenentnahme und Hämiglobinbestimmung, teils manometrisch durch Bestimmung der Kohlenoxydaufnahme gemessen. Für die manometrische Messung schneller Reduktion durch hohe Konzentrationen von altem gelbem Ferment wurden zylindrische Gefäße mit einer Geschwindigkeit von 1000 Umdrehungen je Minute rotiert (Bänder u. Kiese 1955).

Versuche

Altes gelbes Ferment reduzierte Hämiglobin langsamer als Sauerstoff. Bei den für unsere Versuchsansätze gewählten Konzentrationen an Zwischenferment und TPN nahm altes gelbes Ferment in der Konzentration von 10^{-5} Mol · l^{-1} unter Luft bei 37° C 1,75 ml O_2 · l^{-1} · min^{-1} auf (Kiese, Schneider u. Waller 1957),

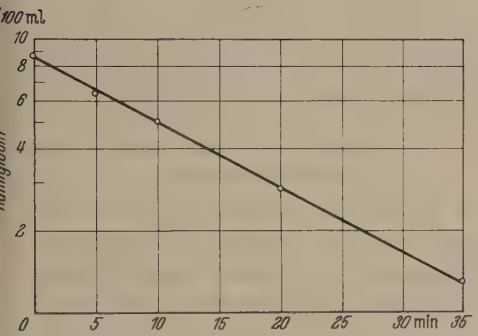


Abb. 1

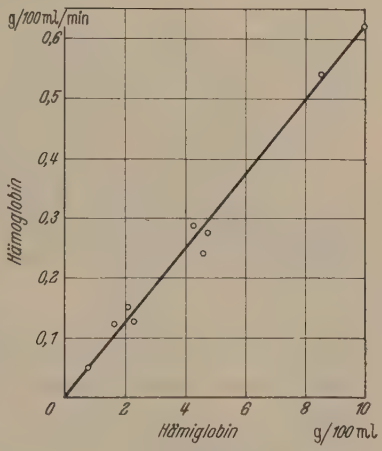


Abb. 2

Abb. 1. Ablauf der Hämiglobinreduktion durch 10^{-5} Mol altes gelbes Ferment je Liter unter Kohlenoxyd. Konzentration des Hämiglobins zu Beginn der Reaktion 8,6 g/100 ml ($5{,}1 \cdot 10^{-3}$ Äquivalent · l^{-1}). Temp. 37° C. Hämiglobinkonzentration optisch bestimmt. Ordinate logarithmisch geteilt

Abb. 2. Reduktion von Hämiglobin durch altes gelbes Ferment. Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Hämiglobinkonzentration. Die Marken bezeichnen die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Ansätzen mit den der Abszisse entsprechenden Hämiglobinkonzentrationen. Altes gelbes Ferment 10^{-5} Mol · l^{-1}. Gasraum Kohlenoxyd. pH 7,4, Temp. 37° C

reduzierte also bei der Sauerstoffkonzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ Mol · l^{-1} in der Minute $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ Äquivalent O_2 · l^{-1}. Hämiglobin wurde unter gleichen Bedingungen nur mit der Geschwindigkeit von $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ Äquivalent · l^{-1} · min^{-1} reduziert.

Der Ablauf der Reduktion des Hämiglobins in einem Ansatz ist in Abb. 1 dargestellt.

Während die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins in roten Zellen nur bei niedrigen Konzentrationen der Konzentration proportional ist, war die Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion durch altes gelbes Ferment (10^{-5} Mol · l^{-1}) der Hämiglobinkonzentration bis

zur höchsten untersuchten Konzentration (10 g/100 ml) proportional (Abb. 2). Daher wurde Hämiglobin auch in Anwesenheit von Luft durch gelbes Ferment schnell reduziert, wenn die Hämiglobinkonzentration hoch war.

Bei konstanter Konzentration von Zwischenferment, TPN und Hämiglobin war die Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion nicht in einfacher Weise von der Konzentration des alten gelben Ferments abhängig. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 3 wiedergegeben. Die einem Massenwirkungsgleichgewicht ähnliche Funktion wird auch bei anderen zusammengesetzten Systemen mit vorgelagerten Reaktionen beobachtet, z. B. in dem ähnlichen System: Sauerstoffübertragendes Ferment — Cytochrom-c — Reduktionsmittel, bei Veränderung der Cytochrom-c-Konzentration (Kiese u. Reinwein 1953).

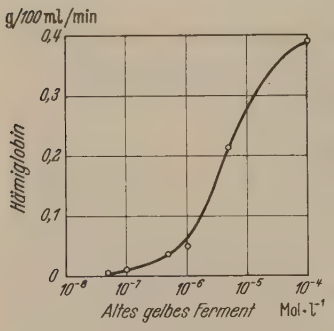


Abb. 3. Reduktion von Hämiglobin durch altes gelbes Ferment. Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Fermentkonzentration. Hämiglobin 4,5 g/100 ml. Gasraum Kohlenoxyd. pH 7,4, Temp. 37° C

Zusammenfassung

Als Modell der enzymischen Reduktion von Hämiglobin wurde die Reduktion von Hämiglobin durch altes gelbes Ferment aus Hefe im System Glucose-6-phosphat, Zwischenferment, TPN, altes gelbes Ferment, Hämiglobin untersucht.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Altmann, K. J.: Biochim. et Biophysica Acta **15**, 155 (1954). — Bänder, A., u. M. Kiese: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 312 (1955). — Davenport, H. E., R. Hill and F. R. Whatley: Proc. Roy. Soc. Lond. B. **139**, 346 (1952). — Haas, E., C. J. Harrer and T. R. Hogness: J. of Biol. Chem. **143**, 341 (1942). — Kiese, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 99 (1949). — Kiese, M., u. D. Reinwein: Biochem. Z. **324**, 51 (1953). — Kiese, M., K. Resag u. C. Schneider: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 170 (1957). — Kiese, M., C. Schneider u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 158 (1957).

Prof. Dr. M. Kiese, Pharmakologisches Institut, Tübingen/Neckar

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 179—185 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg

Fehlen des Hämiglobinreduktase-Systems im Erythrocyten des Schweines

Von
Claus Schneider und Hans-Hermann Wagner

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. April 1957)

Die Atmung der roten Blutzellen vieler Tiere wird durch Zusatz eines reversibel oxydierbaren Farbstoffes auf ein Vielfaches gesteigert, wenn Glucose als Substrat verfügbar ist. Kiese (1946) konnte zeigen, daß die katalytische Wirkung dieser Farbstoffe auf der Reaktion mit Hämiglobinreduktase beruht. Durch Mitwirkung des gleichen Fermentes wird Nitrosobenzol im Erythrocyten zu Phenylhydroxylamin reduziert und dadurch der Kreisprozeß der Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol unterhalten (Kiese u. Waller 1950; Kiese, Resag u. Schneider 1957).

Bei der Untersuchung der Wirkung von Methylenblau auf die Atmung roter Zellen von verschiedenen Tieren fanden wir, daß die Atmungssteigerung mit Glucose als Substrat in Erythrocyten vom Schwein fehlt (Kiese, Schneider u. Waller 1957).

Diese Arbeit enthält Untersuchungen über das Hämiglobinreduktase-System, die Hämiglobinreduktion in roten Zellen des Schweines und die Oxydation des Hämoglobins durch Sauerstoff.

Von dem System Glucose-6-Phosphat — Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Zwischenferment) — Triphosphopyridinnucleotid (TPN) — Hämiglobinreduktase ließen sich in Schweineerythrocyten die Fermente und das Co-Enzym nicht nachweisen.

Die Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol lief halb so schnell ab wie in Erythrocyten vom Hund (Kiese, Reinwein u. Waller 1950). Bei der Konzentration von 10^{-4} Mol Nitrosobenzol je Liter wurden je Mol Nitrosobenzol maximal etwa 11 Äquivalente Hämiglobin gebildet, gegenüber 62 Äquivalenten in Erythrocyten vom Hund oder Rind (Kiese, Reinwein u. Waller 1950). Der Mechanismus der Reduktion des Nitrosobenzols im Schweineerythrocyten ist noch unbekannt.

Die Reduktion von Hämiglobin durch Schweineerythrocyten in Phosphat-Ringer-Lösung wurde durch Zusatz von Glucose nicht beschleunigt. Sie verlief am schnellsten, wenn die Zellen in Schweine-Serum suspendiert wurden. Die Geschwindigkeit der Reduktion in

Serum entsprach der von roten Zellen der Katze bei 20 mg-% Lactat als Substrat (Kiese u. Weis 1943). Mit 200 mg-% Lactat in Phosphat-Ringer-Lösung reduzierten Schweinezellen Hämiglobin nur mit einem Drittel dieser Geschwindigkeit. Demnach ist an der Reduktion des Hämiglobins im Schweineblut neben der Milchsäure noch eine andere Substanz des Serums als Substrat oder Co-Faktor beteiligt. Diese ist dialysabel.

Die Oxydation von Hämoglobin des Schweines durch Sauerstoff verlief doppelt so schnell wie die von Rinderhämoglobin (Kiese u. Schneider 1955).

Methoden

Die Erythrocyten wurden aus Schweineblut, das sofort nach dem Töten der Tiere auf dem Schlachthof gewonnen und durch Zusatz von Citrat ungerinnbar gemacht war, auf der Zentrifuge vom Plasma und den Leukocyten abgetrennt und 3mal mit dem mehrfachen Volumen einer 1%igen Natriumchloridlösung gewaschen. Sie wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Phosphat-Ringer-Lösung suspendiert. Diese wurde hergestellt aus 9 Teilen einer Lösung von 8,3 g Natriumchlorid, 0,23 g Kaliumchlorid und 0,25 g Calciumchlorid in 1000 ml Wasser und einem Teil 0,067 mol Phosphatlösung vom p_H 7,4. Die Zellzahl dieser Suspension betrug $5{,}8 \cdot 10^9$ Erythrocyten je Milliliter, wenn die Suspension 17 g Hämoglobin in 100 ml enthielt.

Hämiglobin wurde in den roten Zellen durch Zugabe des gleichen Volumens 1%iger Natriumnitritlösung hergestellt. Nach ½stündigem Einwirken der Nitritlösung wurden die Zellen 4mal mit 1%iger Natriumchloridlösung gewaschen. Der Blutfarbstoff war zu 93—97% zu Hämiglobin oxydiert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Phosphat-Ringer-Lösung suspendiert.

Die Atmung der roten Zellen wurde durch manometrische Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in Kegelgefäßen der Warburg-Apparatur bei 37° C unter Luft gemessen. Kohlendioxyd wurde durch Kalilauge absorbiert. Die Ansätze enthielten 1 ml Erythrocyten-Suspension, 0,6 ml Phosphat-Ringer-Lösung, 0,2 ml der Lösung des entsprechenden Substrats oder 0,8 ml Schweine-Serum. Aus dem Seitenarm der Kegelgefäße wurden zum gegebenen Zeitpunkt 0,2 ml einer 10^{-3} molaren Methylenblaulösung in den Reaktionsraum eingekippt.

Für die Reduktion des Nitrosobenzols zu Phenylhydroxylamin diente die Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol als Indicator. Die Ansätze enthielten 1 ml Erythrocyten, 0,6 ml Phosphat-Ringer-Lösung, 0,2 ml Lösung des entsprechenden Substrats oder 0,8 ml Schweineserum. Ihnen wurde 0,2 ml Nitrosobenzollösung zugesetzt. Die Ansätze wurden in Rundkolben bei 37° C unter Überleiten von wasserdampfgesättigter Luft langsam geschüttelt. Durch optische Bestimmung wurde die Konzentration des Hämiglobins in Abständen von 10—20 min gemessen.

Die Hämiglobinreduktion wurde in Erythrocyten-Suspensionen durch optische Bestimmung der Konzentration des Hämiglobins und des Gesamtblutfarbstoffes in Abständen von 15—60 min gemessen. Die Ansätze enthielten in Rundkolben 1,5 ml Erythrocyten, 1,2 ml Phosphat-Ringer-Lösung und 0,3 ml Lösung des entsprechenden Substrats oder 1,5 ml Serum. Sie wurden bei 37° C unter stetiger Überleitung von wasserdampfgesättigtem Kohlenoxyd langsam geschüttelt.

Die Oxydation von Hämoglobin durch Sauerstoff wurde in Hämolysaten gemessen. Gewaschene rote Zellen des Schweines wurden durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen hämolysiert, mit n/10 Salzsäure unter Kontrolle der Glaselektrode

auf p_H 5,72 angesäuert und dann von den Zellstromata durch hochtouriges Zentrifugieren befreit. In Rundkolben wurden die Lösungen bei 37° C mit einem Gemisch von Stickstoff und Sauerstoff ins Gleichgewicht gebracht. In Abständen von 1—2 Std wurde die Konzentration des Hämiglobins und Gesamtblutfarbstoffs optisch bestimmt.

Die Milchsäuregärung wurde durch Bestimmung des aus Glucose gebildeten Lactats gemessen. Der Erythrocyten-Suspension wurden 180 mg-% Glucose zugesetzt und in Rundkolben 50 ml dieser Suspension bei 37° C langsam geschüttelt. In Abständen von einer Stunde wurden Proben von 3 ml Suspension entnommen, die roten Zellen auf der Zentrifuge abgetrennt und in dem Überstand das Lactat bestimmt. Die Gärung ließen wir unter Luftabschluß durch Überleiten von wasserdampfgesättigtem Kohlenoxyd ablaufen. Dadurch war die Bildung von Hämiglobin durch Sauerstoff und Verlust von Lactat zur enzymischen Reduktion dieses Hämiglobins ausgeschlossen.

Hämiglobin wurde optisch bei der grünen und gelben Quecksilberlinie im Photometer von Havemann in einer Phosphatlösung vom p_H 6,8 durch Messung der Zunahme der Lichtschwächung bei Zugabe von Cyanid bestimmt, der Gesamtblutfarbstoff als Hämiglobin nach Oxydation durch Ferricyanid.

Milchsäure wurde nach der Methode von Hohorst (1957) enzymisch bestimmt.

Gasgemische wurden in Stahlflaschen hergestellt und nach Haldane (Peters u. van Slyke 1932) analysiert.

Triphosphopyridinnucleotid (TPN), Glucose - 6 - Phosphat - dehydrogenase (Zwischenferment) und altes gelbes Ferment war wie bei Kiese, Schneider u. Waller (1957) angegeben hergestellt, die Zwischenferment-Einheiten wie dort definiert. Hexose-6-Phosphat (Robison-Ester) wurde nach Warburg u. Christian (1932) hergestellt.

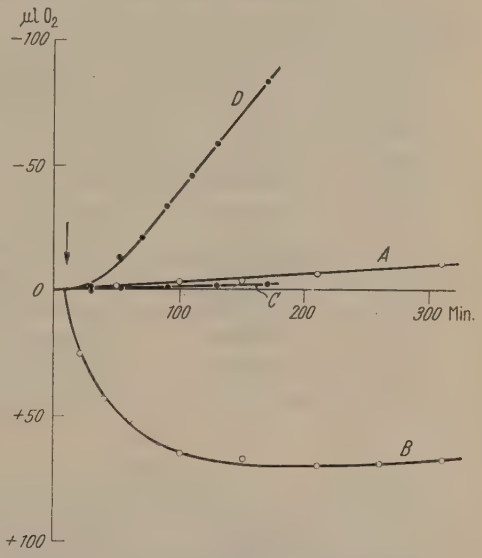


Abb. 1. Sauerstoffaufnahme roter Zellen von Schwein und Rind in Phosphat-Ringer-Lösung p_H 7,4 mit 200 mg-% Glucose. Temperatur 37° C, Gasraum: Luft. o-o-o 2,0 ml Schweineerythrocyten Suspension mit 6,9 g Hb/100 ml. • - • - • 2,0 ml Rindererythrocyten-Suspension mit 9,3 g Hb/100 ml. ↓ Zugabe von $2 \cdot 10^{-7}$ Mol Methylenblau zu den Ansätzen *B* und *D*

Ergebnisse

1. Atmung der Erythrocyten des Schweines. Die Sauerstoffaufnahme der roten Zellen in Phosphat-Ringer-Lösung verlief stetig. Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme änderte sich nicht durch Zusatz von Glucose oder Lactat als Substrat (beide in einer Konzentration von 200 mg in 100 ml Ansatz). Von einem Milliliter Erythrocyten mit einer Hämoglobinkonzentration von 17 g/100 ml wurden 4,0 μl Sauerstoff je Stunde aufgenommen. Zusatz von 10^{-4} Mol Methylenblau je Liter bewirkte durch die Hämiglobinbildung schnelle

Freisetzung eines konstanten Volumens Sauerstoff. Die Atmung der Zellen stellte sich nach Ablauf der Hämiglobinbildung auch mit Glucose oder Lactat als Substrat auf die gleiche Geschwindigkeit wie in den Ansätzen ohne Methylenblau ein. In Ansätzen mit 200 mg-% Glucose wurde je Molekel Methylenblau soviel Sauerstoff freigesetzt wie bei der Oxydation von 5 Äquivalenten Oxyhämoglobin zu Hämiglobin entsteht (Abb. 1).

Das Fehlen der Atmungssteigerung durch Zusatz von Methylenblau und Glucose als Substrat ließ die Frage offen, ob das gesamte Hämiglobinreduktase-System oder ein Glied des Enzymsystems Glucose-6-Phosphat — Zwischenferment — TPN — Hämiglobinreduktase in den Erythrocyten des Schweines nicht vorhanden ist. Die Tab. 1 gibt das

Tabelle 1. *Nachweis von Triphosphopyridinnucleotid, Zwischenferment und Hämiglobinreduktase im Hämolysat von Schweine-Erythrocyten*

Die Ansätze hatten ein Volumen von 2,2 ml und enthielten Triäthanolamin-HCl 0,1 mol, p_H 7,4, 0,2 ml. Dinatriumäthylendiamintetraacetat $2 \cdot 10^{-6}$ Mole. Hämolysat: gewaschene Erythrocyten des Schweines mit gleichen Teilen Wasser hämolysiert, 13,5 g Hämoglobin/100 ml. Temperatur 37° C, Gasraum: Luft

Einsatz	0,2 ml 10%ige NaOH	=	=	=
Hauptraum	Hämolysat 1,0 ml Zwischenferment 1 Einheit Hexose-6-Phosphat 5 mg	Hämolysat 1,0 ml — Hexose-6-Phosphat 5 mg	Hämolysat 1,0 ml Zwischenferment 1 Einheit Hexose-6-Phosphat 5 mg	Wasser 1,0 ml Zwischenferment 1 Einheit TPN-Präparat 3 mg altes gelbes Ferment $2 \cdot 10^{-8}$ Mole
Birne	altes gelbes Ferment $2 \cdot 10^{-8}$ Mole —	altes gelbes Ferment $2 \cdot 10^{-8}$ Mole TPN-Präparat 3 mg	Methylenblau $2 \cdot 10^{-7}$ Mole TPN-Präparat 3 mg	Hexose-6-Phosphat 5 mg
$\mu l\, O_2$/Std	—2,2	—2,8	+6,0	—210

Protokoll von Versuchen, in denen die Komponenten des Enzymsystems im Hämolysat von Schweineerythrocyten einzeln ergänzt wurden. Wie die Tabelle zeigt, waren Zwischenferment, Hämiglobinreduktase und TPN in den roten Zellen des Schweines nicht nachzuweisen.

2. Die Reduktion von Nitrosobenzol in Schweine-Erythrocyten. Nach Zugabe von Nitrosobenzol in der Konzentration von 10^{-4} Mol je Liter zu einer Erythrocyten-Suspension in Phosphat-Ringer-Lösung begann sofort die Hämiglobinbildung. Nach etwa 50 min war die maximale Hämiglobinkonzentration erreicht. Diese Reaktion lief ohne Substrat mit annähernd gleicher Geschwindigkeit und Ausbeute an Hämiglobin wie unter Zusatz von Glucose oder Lactat ab. In Abb. 2 ist der Ablauf dieser Reaktion mit Glucose als „Substrat" mit der gleichen Reaktion bei Erythrocyten des Hundes verglichen. Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei Schweine-Erythrocyten und die maximal gebildete Menge Hämiglobin je Molekel Nitrosobenzol zeigt Tab. 2.

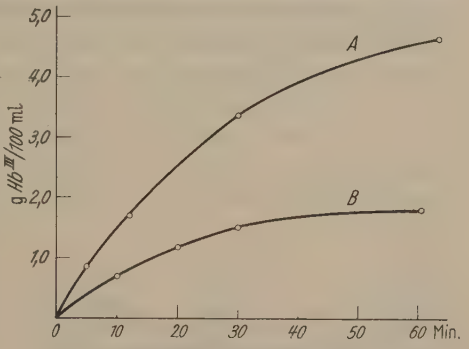


Abb. 2. Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol in roten Zellen vom Hund (*A*) und vom Schwein (*B*). Erythrocyten-Suspensionen in Phosphat-Ringer-Lösung mit p_H 7,4 unter Luft, etwa 15 g Hämoglobin/100 ml. Nitrosobenzol 10^{-4} Mol/l; Zusatz von Glucose bei *A* 300 mg-%, bei *B* 200 mg-%; Temperatur 37° C. Die Werte für *A* sind entnommen aus KIESE und WALLER (1950)

Durch Verdoppelung der Nitrosobenzol-Konzentration nach Erreichen der maximal gebildeten Hämiglobin-Konzentration (nach 60 min) wurde auch ohne Substrat im Ansatz eine weitere Hämiglobinbildung bewirkt. Der Zuwachs an Hämiglobin machte 50% der im Ansatz vorhandenen Hämiglobinkonzentration aus.

3. Hämiglobinreduktion. In Tab. 3 sind die Geschwindigkeiten der Hämiglobinreduktion mit Glucose, Lactat und Schweine-Serum als Substrat zusammengestellt. Mit Glucose als Substrat war eine Hämiglobinreduktion nicht meßbar, mit Lactat verlief sie stetig, erreichte aber nur ein Drittel der Geschwindigkeit, die durch Zusatz von Schweine-Serum erzielt wurde. Die Lactatkonzentration in einem Ansatz mit Serum betrug etwa 100 mg in 100 ml Phosphat-Ringer-Lösung, von der ein Teil

Tabelle 2

Anfangsgeschwindigkeit und maximal gebildete Menge Hämiglobin je Molekel Nitrosobenzol bei der Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol in Erythrocyten vom Schwein in Phosphat-Ringer-Lösung p_H 7,4 unter Luft

Nitrosobenzol 10^{-4} Mol/l, Temperatur 37° C. Anfangsgeschwindigkeiten bei 17 g Hb/100 ml Erythrocyten-Suspension und Ausbeute an Hämiglobin bei 12,5 bis 15,0 g Hb/100 ml Suspension gemessen

Zusatz	g Hb^{III}/100 ml/min	Äquivalente Hb^{III}/Mol Nitrosobenzol
ohne Zusatz	0,1	11,1
Glucose 200 mg-% .	0,1	12,1
Lactat 200 mg-% . .	0,12	9,7

gegen 2,5 Teile Schweine-Serum dialysiert war, reduzierte schneller als 200 mg-% Lactat.

Die Milchsäurekonzentration in unverdünntem Schweine-Serum wurde bei 4 Tieren im Mittel zu 206 mg je 100 ml Serum gefunden; die Glucosekonzentration im Mittel zu 115 mg je 100 ml.

Die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung aus Glucose war $1{,}3 \cdot 10^{-3}$ Mol je Liter Zellsuspension und Stunde bei 13,9 g Hämoglobin je 100 ml. Ähnliche Geschwindigkeiten wurden an Erythrocyten von Katzen, Meerschweinchen und Kaninchen gemessen (Kiese u. Schwartzkopff 1947).

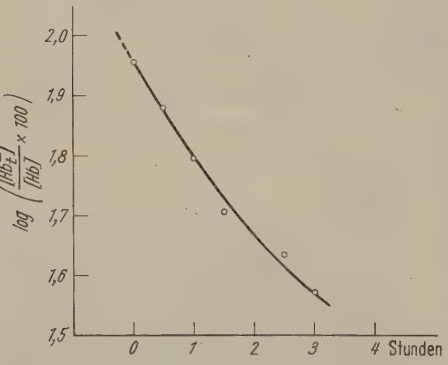


Abb. 3. Geschwindigkeit der Oxydation von Schweinehämoglobin durch Sauerstoff. Sauerstoffdruck 26,5 Torr, pH 5,72, Temperatur 37° C; Hämoglobinkonzentration 22,8 g/100 ml. [Hb_t^{II}] = Konzentration des Hämoglobins (freies Hämoglobin + Oxyhämoglobin) zur Zeit t; [Hb] = Konzentration des Gesamtblutfarbstoffs (freies Hämoglobin + Oxyhämoglobin + Hämiglobin)

4. Oxydation des Hämoglobins durch Sauerstoff. Die Oxydation des Hämoglobins durch Sauerstoff wurde in saurer Lösung bei niedrigem Sauerstoffdruck (26,5 Torr) und 37° C gemessen. Unter diesen Bedingungen verläuft die Reaktion schnell (Brooks 1932, 1935, Kiese u. Schneider, 1955). In Abb. 3 ist der Ablauf der Reaktion dargestellt. Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit der Oxydation in hämiglobinfreier Lösung wurde vom Zeitpunkt der ersten Messung gegen die Hämiglobinkonzentration 0 extrapoliert. Die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung, $\frac{\Delta\,[Hb^{III}]}{\Delta t \cdot [Hb^{II}]}$, war zu Anfang der Reaktion im Mittel 0,42 (Hb^{III} = Hämiglobin, Hb^{II} = freies Hämoglobin + Oxyhämoglobin, t in Stunden). Für Rinderhämoglobin fanden Kiese u. Schneider (1955) unter gleichen Bedingungen 0,25, für Menschenhämoglobin Kiese, Kurz u. Schneider (1956) 0,12.

Tabelle 3. *Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion in Schweine-Erythrocyten* (γ Hb^{III}/Mil. Erythrocyten/Std)

Erythrocyten-Suspension in Phosphat-Ringer-Lösung bzw. Serum unter Kohlenoxyd. Temperatur 37° C

ohne Substrat	Glucose 200 mg-%	Lactat 200 mg-%	Schweine-Serum	gegen Serum dialysierte Phosphat-Ringer-Lösung
0,0	0,0	0,9	3,1	1,5

Zusammenfassung

Die Atmung von Schweine-Erythrocyten wird durch Zusatz von Methylenblau nicht gesteigert.

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Zwischenferment), Hämiglobinreduktase und Triphosphopyridinnucleotid waren in Schweine-Erythrocyten nicht nachzuweisen.

Nitrosobenzol wird durch rote Zellen vom Schwein langsamer reduziert als in Erythrocyten anderer Tiere; der Mechanismus der Reduktion in Schweine-Erythrocyten ist noch unbekannt.

Hämiglobin wird durch Schweine-Erythrocyten mit Milchsäure reduziert. Schneller verläuft die Reduktion, wenn die Zellen in Schweine-Serum suspendiert werden.

Literatur

Brooks, J.: Proc. Roy. Soc. (Lond.) **B 109**, 35 (1932); **B 118**, 560 (1935). — Hohorst, H. J.: Biochem. Z. **328**, 509 (1957). — Kiese, M.: Klin. Wschr. **1946**, 81. — Kiese, M., H. Kurz u. C. Schneider: Klin. Wschr. **1956**, 957. — Kiese, M., D. Reinwein u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 393 (1950). — Kiese, M., K. Resag u. C. Schneider: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 170 (1957). — Kiese, M., u. C. Schneider: Biochem. Z. **326**, 209 (1955). — Kiese, M., C. Schneider u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 158 (1957). — Kiese, M., u. W. Schwartzkopff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 267 (1947). — Kiese, M., u. H.-D. Waller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 345 (1950). — Kiese, M., u. B. Weis: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 493 (1943). — Peters, J. P., and D. D. van Slyke: Quantitative clinical chemistry. London 1932. — Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **254**, 438 (1932).

Prof. Dr. M. Kiese, Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen (Neckar)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 186—198 (1957)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. G. Schubert)

Beeinflussung experimentell-pathologischer Veränderungen bei Nagern durch Hyaluronsäure

Von
W. Brandstetter, E. Kiesewetter und F. X. Wohlzogen

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 23. April 1957)

Die Hyaluronsäure (HS) gehört chemisch zur Gruppe der sauren Mucopolysaccharide. Sie ist aus Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin aufgebaut und kommt in verschiedenen Polymerisationsgraden als langkettiges Molekül (bis 10000 Å) vor. Für die biologische Bedeutung der HS sind neben ihrem starken Wasserbindungsvermögen noch folgende physikalischen Eigenschaften von HS-Lösungen in Betracht zu ziehen: hohe Viscosität und Schutzkolloidwirkung.

Im tierischen Organismus kommt die HS vor allem in der Grundsubstanz des Bindegewebes vor. Als funktionell bedeutungsvoll erscheint der HS-Gehalt der pericapillaren Schicht. Darüber hinaus ist die HS des Zwischengewebes nicht als inerte Substanz anzusehen.

Dorfman u. Schiller (1956) konnten in Versuchen an Nagern unter Verwendung radioaktiver Isotope den Nachweis erbringen, daß HS im Vergleich zu den anderen Mucopolysacchariden einen viel regeren Stoffwechsel zeigt, d. h. im Organismus ständig neu gebildet und ab- bzw. umgebaut wird. Die genannten Autoren (loc. cit.) konnten auch zeigen, daß dem Insulin eine wesentliche Rolle im HS-Stoffwechsel, und zwar vor allem für die Biosynthese der HS zukommt. Die bei Diabetes beobachtete schlechte Wundheilung, Infektionsanfälligkeit und vasculären Degenerationen könnten damit in ursächlichem Zusammenhang stehen.

Im Hinblick auf den regen HS-Stoffwechsel erscheint es angebracht, zur Beurteilung der physiologischen Bedeutung der HS nicht nur diese isoliert, sondern das HS-Hyaluronidase-System als funktionelle Einheit zu betrachten. Nur so wird es verständlich, daß HS und Hyaluronidase teilweise entgegengesetzte Wirkungen im Organismus entfalten, teilweise aber gleichsinnig wirken, d. h. daß Ferment und Substrat den gleichen Effekt auslösen.

So ist es z. B. zu erklären, daß die von Butt et al. (1952a, b) nach parenteraler Hyaluronidase-Verabreichung festgestellten Veränderungen des Harnsedimentes, auf Grund deren auf eine Erhöhung des Schutzkolloidgehaltes des Harnes geschlossen wurde, von Wohlzogen (1952) nicht nur bestätigt, sondern auch durch orale Hyaluron*säure*-Medikation reproduziert werden konnten (Wohlzogen u. Brandstetter 1953).

Es kann angenommen werden, daß das HS-Hyaluronidase-System nicht nur zufolge der physikalisch-chemischen Eigenschaften der HS regulierend in den Flüssigkeitshaushalt des Organismus eingreift, sondern auch gemäß dem HS-Vorkommen in der pericapillaren Schicht bei dort lokalisierten pathologischen Prozessen einen Einfluß entfalten kann, bzw. daß der HS als integrierendem Bestandteil der mesenchymalen Grundsubstanz ganz allgemein eine Rolle bei Permeabilitätsvorgängen zukommt.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden angestellt, um die Bedeutung der HS als Schutzkolloid und als permeabilitätsbeeinflussender Faktor zu prüfen. Zu diesem Zwecke wurden bei den Versuchstieren experimentell verschiedene pathologische Veränderungen durch Oxamid, Eubasin, α-Naphthyl-Thioharnstoff und Uranylnitrat erzeugt und die Effekte dieser Noxen an Tieren mit und ohne HS-Behandlung verglichen.

Methodik

Oxamid[1]-Vergiftung. 24 Albinoratten mit einem Körpergewicht von 100—120 g wurden unter zufallsmäßiger Auswahl in 2 Gruppen zu je 12 Tieren geteilt. Die Tiere der einen Gruppe erhielten täglich 0,5 mg HS[2] in wäßriger Lösung mittels Schlundsonde. Nach 14 Tagen wurde allen Tieren zweimal täglich durch Schlundsonde 2,5 ml einer wäßrigen 1%igen Oxamidlösung gegeben, was einer Dosierung von 50 mg Oxamid pro Tier und Tag entspricht. Die mit HS vorbehandelten Ratten erhielten weiterhin 0,5 mg HS pro Tag in Form eines Zusatzes von 0,25 mg HS pro Sonde.

Während der Versuche wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten. Zur Beurteilung der Oxamid-Vergiftung bzw. deren Beeinflussung durch HS wurden folgende Kriterien gewählt:

1. Auftreten von Steinkrisen (Kolloidkörperchen, Mikro- und Sphärolithen im Harn).
2. Auftreten von Hämaturie.
3. Überlebensdauer.

Eubasin[3]-Vergiftung. 30 männliche Albinoratten (Körpergewicht 100—120 g) wurden unter zufallsmäßiger Auswahl in 2 Gruppen zu je 15 Tieren geteilt, die während der ganzen Versuchsperiode unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. In einer Vorperiode wurden die Tiere daran gewöhnt, ihr Futter, bestehend aus einem mit Wasser zu einer formbaren Paste bereitetem Gemisch von Trockenmilch, Schrotmehl, Weizenkeimlingen, Hefe und Kleie, in Form einer Kugel von etwa 25 g pro Tag anzunehmen und unter Beobachtung zu fressen. Diesen Futterkugeln wurden für die 15 Tiere der einen Gruppe je 10 mg HS zugesetzt. Wasser wurde allen Tieren während des ganzen Versuches ad lib. gegeben.

Nach 14tägiger Vorbehandlung der einen Versuchstiergruppe mit HS wurden sämtlichen Futterkugeln je 180 mg Eubasin an 5 aufeinanderfolgenden Tagen beigefügt. Das Futter der mit HS vorbehandelten Tiere enthielt außerdem weiterhin 10 mg HS pro die bis zum Versuchsende.

Am 5. Tage nach Beginn der Eubasin-Verabreichung wurden aus jeder der 2 Versuchstiergruppen je 5 zufallsmäßig ausgewählte Tiere mit Leuchtgas getötet

[1] Oxalsäurediamid, rein, Schering-Kahlbaum.

[2] K-Salz der Hyaluronsäure aus Nabelschnüren.

[3] N^1 (2-Pyridyl) sulfanilsäureamid, Nordmark.

und die restlichen Tiere — soweit sie bis dahin nicht eingegangen waren — nach weiteren 7 Tagen getötet.

Beobachtungskriterien waren:

1. Die Häufigkeit spontaner Todesfälle in den Gruppen bis einschließlich 5. Tag nach Beginn der Eubasin-Medikation.

2. Auftreten makroskopisch feststellbarer Konkremente im Urogenitaltrakt der eingegangenen bzw. getöteten Tiere während der gesamten Versuchsperiode.

3. Rest-N der am 5. bzw. 12. Tag nach Beginn der Eubasin-Verabreichung getöteten Tiere (bestimmt im Vollblut nach Kjeldahl).

α-NTH[1]-Vergiftung. Für diese Untersuchung wurden insgesamt 120 Albinoratten (60 Männchen und 60 Weibchen, Körpergewicht 120—150 g) verwendet. In 2 gleichartigen Versuchsserien wurden von 3 Versuchstiergruppen, zu je 10 Männchen und 10 Weibchen,

1 eine als Kontrolle unbehandelt belassen,

2. eine mit α-NTH vergiftet und

3. eine 14 Tage mit HS vorbehandelt und hierauf mit α-NTH vergiftet.

Die Fütterung der Tiere und die orale HS-Vorbehandlung (10 mg pro Tier und Tag) erfolgte in analoger Weise wie bei den Eubasin-Versuchen.

α-NTH wurde in einer Dosierung von 5 mg pro Tier, in 1 ml einer Wasser-Olivenöl-Emulsion (1 : 15, mit 1% Tween-80 Zusatz) suspendiert, i.p. injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten die gleiche Wasser-Öl-Emulsion, aber ohne α-NTH, i.p. Fünf Std nach der Injektion wurden die Tiere mit Leuchtgas getötet, die Lungen nach der von Joffe (1954) beschriebenen Methode präpariert, gewogen, von der Trachea her aufgeblasen, 12 Std an der Luft und hierauf im Vakuum über Silicagel bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Differenz zwischen Frisch- und Trockengewicht bestimmt.

Uranyl[2]-Vergiftung. Für den Versuch wurden 4 Kaninchen ($2^1/_2$—3 kg Körpergewicht) angesetzt. 2 Tiere erhielten täglich 20 mg HS in 10 ml körperwarmem Wasser mittels Schlundsonde, 2 Tieren wurde auf die gleiche Weise dieselbe Menge Wasser, aber ohne HS gegeben. Da eines der mit HS vorbehandelten Kaninchen durch Unfall einging, standen für die Uranyl-Vergiftung, 14 Tage nach Beginn der HS-Medikation, nur 3 Tiere, 2 unbehandelte und 1 HS-vorbehandeltes zur Verfügung.

Jedem der Versuchstiere wurden zweimal je 0,6 mg Uranylnitrat/kg Körpergewicht, gelöst in 5 ml isotoner NaCl-Lösung, in einem Intervall von 48 Std i.v. injiziert. Weitere 48 Std nach der 2. Injektion wurden die Tiere getötet, obduziert, Nieren- und Leberstücke in Formol fixiert und davon mikroskopische Präparate angefertigt.

Die HS- bzw. Plazebobehandlung lief während der Uranyl-Verabreichung in gleicher Weise wie in der Vorbehandlungsperiode weiter.

Versuchsergebnisse

Oxamid-Vergiftnug Der Einfluß von HS-Behandlung auf den Verlauf der Oxamid-Vergiftung bei Ratten zeigte sich in einem etwas späteren Einsetzen der Steinkrisen und in einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit; der Zeitpunkt des Auftretens und das Ausmaß der Hämaturie blieb durch HS unbeeinflußt. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

[1] α-Naphthylthioharnstoff, Light.

[2] $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6\,H_2O$, p. a., Riedel de Haen.

Bei der Obduktion wurden bei sämtlichen Tieren Konkremente im Urogenitaltrakt und mehr oder minder stark ausgebildete Hydronephrose gefunden. Durch die HS-Behandlung konnte somit die Bildung von Konkrementen nicht verhindert werden. Ob es unter HS zu einer Verzögerung in der Ausbildung von Konkrementen kam, konnte nicht

Tabelle 1. *Befunde bei Oxamid-Vergiftung*

Behandlung	Überlebenszeit Tage	Steinkrisen	Hämaturie
Oxamid	6— 7	ab 1. Tag	ab 1.—2. Tag
Oxamid + HS	13—14	ab 2. Tag	ab 1.—3. Tag

entschieden werden, da sämtliche Tiere der Kontrollgruppe (Oxamid ohne HS) bis spätestens zum 7. Tag nach Beginn der Oxamid-Verabreichung eingegangen waren, während die HS-behandelten Ratten erst vom 13. Tag an ad exitum kamen und demzufolge keine Obduktionsbefunde für denselben Zeitpunkt wie bei der Kontrollgruppe vorliegen.

Eubasin-Vergiftung. Die Versuchsanlage und die Ergebnisse hinsichtlich Überlebenszeit und Konkrementhäufigkeit sind aus Tab. 2 ersichtlich.

Tabelle 2. *Befunde bei Eubasin-Vergiftung*
Kontrollgruppe (ohne Vorbehandlung)

Tag		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Summe
Behandlung		E	E	E	E	E	—	—	—	—	—	—	—	
Tierzahl	eingegangen	—	—	3	3	2	1	—	—	—	—	—	—	9
	getötet	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	1	6
	mit Konkrementen .	—	—	1	2	3	1	—	—	—	—	—	—	7

Behandlungsgruppe (mit HS-Vorbehandlung)

Behandlung		E + H	E + H	E + H	E + H	E + H	H	H	H	H	H	H	H	
Tierzahl	eingegangen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
	getötet	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	10	15
	mit Konkrementen .	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1

Behandlung: E = 180 mg Eubasin, H = 10 mg Hyaluronsäure.

HS-Behandlung hatte einen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Ratten während der ersten 5 Tage der Eubasin-Vergiftung: Während in der Kontrollgruppe (Eubasin ohne HS) innerhalb von 5 Tagen 8 von 15 Tieren eingingen, blieben in der mit HS behandelten Gruppe alle am Leben. Der Unterschied zwischen den beobachteten Sterbequoten $^{8}/_{15}$ gegenüber $^{0}/_{15}$ ergibt bei statistischer Prüfung $\chi^2 = 8{,}35$ ($P < 0{,}01$); der Befund, daß die Ratten ohne HS-Behandlung früher an der

Eubasin-Vergiftung eingingen als die unter HS-Behandlung, ist somit für die 99%-Wahrscheinlichkeitsstufe statistisch gesichert.

Hinsichtlich des Auftretens makroskopisch sichtbarer Konkremente im Urogenitaltrakt bei einem Teil der Versuchstiere wurden folgende Häufigkeiten beobachtet: $^{7}/_{15}$ in der Kontrollgruppe gegenüber $^{1}/_{15}$ in der mit HS behandelten Gruppe. Die Prüfung dieses Ergebnisses ergab $\chi^2 = 4{,}26$ ($P < 0{,}05$), so daß der beobachtete hemmende Einfluß der HS-Behandlung auf die Konkrementbildung statistisch für die 95%-Wahrscheinlichkeitsstufe gesichert ist.

Die Ergebnisse der Rest-N-Bestimmungen im Vollblut der am 5. bzw. am 12. Tag nach Beginn der Eubasin-Medikation getöteten Ratten sind in Tab. 3 angeführt.

Tabelle 3. *Rest-N-Werte bei Eubasin-Vergiftung*

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Vollblut-Rest-N in mg-%	64,3	37,0	44,8
			44,8
	66,4	44,5	46,2
			48,6
	67,5	51,0	50,8
			53,2
	71,1	68,6	53,2
			56,8
	72,0	75,6	57,4
			59,6
Mittelwerte	68,3	55,3	51,5

Gruppe A: Getötet am 5. Versuchstag (5 Tiere ohne HS). Gruppe B: Getötet am 5. Versuchstag (5 Tiere mit HS). Gruppe C: Getötet am 12. Versuchstag (10 Tiere mit HS).

Die statistische Prüfung ergab, daß sich die am 5. Tag getötete, mit HS behandelte Versuchstiergruppe B hinsichtlich der Rest-N-Werte nicht signifikant von den beiden anderen Gruppen A und C unterschied; dies ist vor allem durch die starke Streuung der Werte in Gruppe B bedingt, ein Punkt, auf den noch in der Diskussion näher einzugehen sein wird.

α-NTH-Vergiftung. Zur Beurteilung des durch α-NTH experimentell erzeugten Lungenödems wurde der relative Flüssigkeitsgehalt der Lungen der Versuchstiere berechnet. Da die gefundene Gewichtsdifferenz zwischen Frisch- und Trockengewicht durch den Flüssigkeitsverlust der Lungen beim Trocknen bedingt ist und somit dem absoluten Flüssigkeitsgehalt der Lungen entspricht, ergibt sich der relative Flüssigkeitsgehalt, bezogen auf das Frischgewicht, aus dem Quotienten Gewichtsdifferenz/Frischgewicht. Dieser Wert wurde für die Lungen jedes einzelnen

Versuchstieres berechnet und daraus für die jeweiligen Gruppen — zu je 10 Tieren gleichen Geschlechtes, mit der gleichen Behandlung und in der gleichen Versuchsserie — die Mittelwerte mit den zugehörigen Streuungen berechnet. In dieser Form sind die Versuchsergebnisse in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4. *Befunde bei α-NTH-Vergiftung*

	Versuchsserie 1		Versuchsserie 2	
	♂	♀	♂	♀
Kontrollen	79,9 ± 0,6	79,4 ± 1,4	79,3 ± 0,7	80,1 ± 0,9
α-NTH	82,4 ± 1,1	83,2 ± 0,6	84,5 ± 1,7	83,9 ± 1,1
α-NTH + HS . . .	80,1 ± 1,1	82,9 ± 1,1	83,2 ± 0,9	83,5 ± 1,1

Mittelwerte des Flüssigkeitsgehaltes der Lungen in Prozent des Frischgewichtes ± Standardabweichung des Mittelwertes.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen mit HS behandelten und den entsprechenden nur mit α-NTH vergifteten Gruppen wurden im X-Test nach VAN DER WAERDEN u. NIEVERGELT (1956) auf ihre Signifikanz geprüft.

Dieser Test wurde an Stelle des sonst üblichen Studentschen *t*-Testes angewandt, da er verteilungsfrei ist, also auch dann Gültigkeit besitzt, wenn in den zu vergleichenden Gruppen keine Normalverteilung vorliegt.

Lediglich für die männlichen Ratten der ersten Versuchsserie ergab sich ein signifikant geringerer Flüssigkeitsgehalt der Lungen der mit HS behandelten Tiere: $X = 6{,}58$, entsprechend einem $P < 0{,}005$. Dies war auch die einzige Gruppe, für die der Unterschied gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolltiergruppe insignifikant klein war; somit führte die HS-Behandlung der männlichen Ratten in der 1. Versuchsserie nicht nur zu einer statistisch gesicherten Beeinflussung des Lungenödems, sondern es wurde in dieser Hinsicht die Wirkung der α-NTH-Vergiftung durch HS aufgehoben.

Um zu einer Gesamtbeurteilung der verschiedenen im Versuchsansatz berücksichtigten Faktoren — Behandlung, Geschlecht, Versuchsserie — zu kommen, wurden die Ergebnisse sämtlicher mit α-NTH vergifteten Versuchstiergruppen, mit und ohne HS-Behandlung, varianzanalytisch untersucht.

Die Voraussetzung für die Berechtigung einer Varianzanalyse erschien gegeben, da sich bei der Prüfung auf Homogenität der Streuungen innerhalb der einzelnen Gruppen gemäß dem BARTLETT-Test ein insignifikant kleines χ^2 ergab.

Für jeden der untersuchten Faktoren ergab sich bei der Varianzanalyse ein signifikanter *F*-Wert, und zwar mit den Zufallswahrscheinlichkeiten $P < 0{,}01$ für „Behandlung", $P < 0{,}05$ für „Geschlecht" und $P < 0{,}001$ für „Versuchsserie". Von den Wechselwirkungen erwies sich

nur diejenige zwischen Geschlecht und Versuchsserie als schwach gesichert ($P < 0{,}05$). In Tab. 5 sind die Ergebnisse der Varianzanalyse in Übersichtsform dargestellt.

Tabelle 5. *Synopsis der statistischen Auswertungen*

Effekt von	Mittel	HS-Behandlung		Geschlecht		Versuchsserie	
		ohne	mit	♂	♀	1	2
Behandlung	1,07[2]	—	—	1,78[4]	0,36	1,30[4]	0,84
Geschlecht	0,83[1]	0,12	1,54[5]	—	—	1,79[6]	—0,13
Serie	1,65[3]	1,42[5]	1,88[6]	2,61[6]	0,69	—	—

Bezeichnung der Signifikanzstufen gemäß F-Test: [1] $P < 0{,}05$, [2] $P < 0{,}01$, [3] $P < 0{,}001$; X-Test: [4] $P < 0{,}05$, [5] $P < 0{,}02$, [6] $P < 0{,}01$.

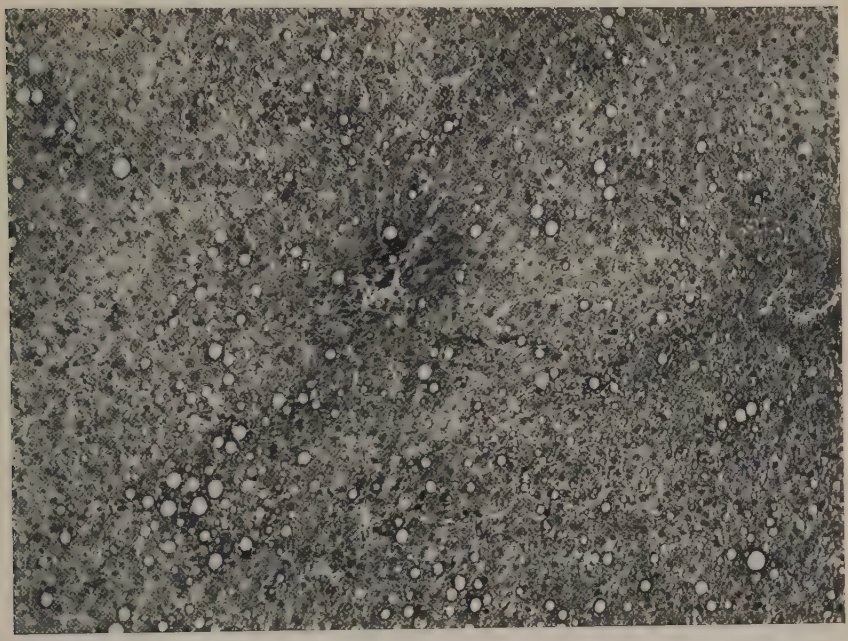
Der durchschnittliche Effekt jeder der 3 im Versuchsansatz berücksichtigten Faktoren ist in der ersten Spalte unter „Mittel" angeführt. In den folgenden Spalten der Tab. 5 sind die Auswirkungen je eines Faktors pro Zeile in Verbindung mit den anderen Faktoren, unter Berücksichtigung der gefundenen Wechselwirkungen, wiedergegeben. Die Zahlen entsprechen der Differenz des Flüssigkeitsgehaltes der Lungen (in % des Lungenfrischgewichtes), und zwar im einzelnen für „Behandlung": Erhöhter Flüssigkeitsgehalt der Lungen der Tiere ohne gegenüber mit HS-Behandlung; für „Geschlecht": Erhöhter Flüssigkeitsgehalt der Lungen der weiblichen gegenüber männlichen Tieren; und schließlich für „Serie": erhöhter Flüssigkeitsgehalt der Lungen der Tiere in der 2. gegenüber der 1. Versuchsserie.

Diese Darstellung der Versuchsergebnisse beinhaltet sämtliche durch den faktoriellen Versuchsansatz ermöglichten und durch die Varianzanalyse ausgeschöpften Informationen. Sie stellt die Grundlage für die im Abschnitt „Diskussion" besprochenen Schlußfolgerungen dar.

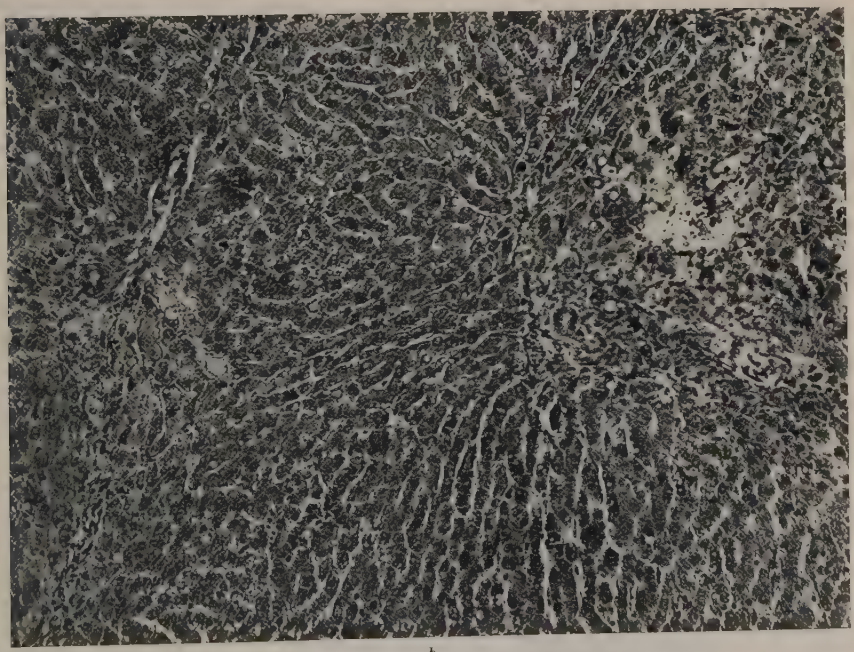
Uranyl-Vergiftung. Die Uranyl-Vergiftung äußerte sich bei beiden Kontrolltieren übereinstimmend in einer zunehmend schweren Störung des Allgemeinbefindens. Das unter HS stehende Kaninchen zeigte demgegenüber normales Verhalten ohne irgendwelche klinischen Vergiftungssymptome.

Als pathologisch-anatomisches Substrat dieses unterschiedlichen Verhaltens der Versuchstiere ergab sich bei der Autopsie (am 4. Tag nach Beginn der Uranyl-Verabreichung): Bei den Kontrolltieren, die nur Uranylnitrat ohne HS erhalten hatten, war in beiden Fällen die Leber vergrößert, von gelblichem Farbton, sehr brüchig und zeigte auf der Schnittfläche das Bild einer Muskatnußleber; trübe Schwellung der Nieren, sonstiger Befund unauffällig. Im Gegensatz dazu ließ das mit HS behandelte Tier die schweren Leberveränderungen vermissen und zeigte nur trübe Schwellung von Leber und Nieren.

Der histologische Befund der Kontrolltiere ergab für die Leber übereinstimmend schwere degenerative Veränderungen mit teilweise vollkommener Aufhebung der Struktur, fettige Degeneration der Leberazini, vereinzelte Blutextravasate und lymphocytäre Infiltrationen (siehe Abb. 1a). An den Nieren: Trübe Schwellung, vereinzelt Zelldegenerationen und Eiweißcylinder. Das mit HS behandelte Tier zeigte histologisch an den Nieren denselben Befund, nur ohne Cylinder, an der Leber erhaltene Struktur ohne fettige Degeneration, vereinzelt Kerndegeneration und Erweiterung der Disseschen Räume (siehe Abb. 1b).



a



b

Abb. 1 a u. b. Kaninchenleber nach Uranyl-Vergiftung (Vergr. 150×).
a ohne HS, *b* mit HS-Vorbehandlung

Diskussion

Wie bereits einleitend erwähnt, wurden die vorliegenden Versuche angestellt, um zu einer Abschätzung der Bedeutung der HS für Permeabilitätsvorgänge und Schutzkolloidwirkung im Säugerorganismus zu gelangen. Es sei hier ausdrücklich betont, daß HS in allen Versuchen oral verabreicht wurde. Es erscheint nicht angängig, wie dies Voit u. Hirsch (1955) getan haben, auf Grund der Ergebnisse *subcutaner* HS-Zufuhr die von anderen Untersuchern (Wohlzogen u. Brandstetter 1953) beobachteten Wirkungen *oraler* HS-Medikation in Abrede zu stellen. Tatsächlich konnten auch Wohlzogen u. Brandstetter die bisher nicht veröffentlichte Beobachtung machen, daß beim Menschen HS als s.c. Injektion selbst mit dem 10fachen der oral wirksamen Dosis keinen Effekt auf das Harnsediment bei Oxalurie ausübt. Eine Erklärung hierfür erscheint dadurch gegeben, daß ein Depot hochpolymerer HS an der Injektionsstelle das dynamische Gleichgewicht des HS-Hyaluronidase-Systems in viel geringerem Maße beeinflußt als oral zugeführte HS, die weitgehend depolymerisiert bzw. abgebaut resorbiert wird und im ganzen Organismus verteilt zur Wirkung kommt. So wird es auch verständlich, daß die in den hier mitgeteilten Versuchen verwendeten, absolut gering erscheinenden Dosen oral verabreichter HS dennoch nachweisbare Effekte zeigten, vor allem wenn berücksichtigt wird, daß diese Dosen größenordnungsmäßig der aktiv am Stoffwechsel teilhabenden körpereigenen HS entsprechen. Inwieweit aus den hier mitgeteilten Versuchsergebnissen Aussagen über die Bedeutung der HS für den Säugerorganismus gerechtfertigt erscheinen, soll im folgenden besprochen werden.

Koch (1950) fand, daß perorale Oxamid-Verabreichung bei Ratten sehr rasch Steinkrisen auslöst, charakterisiert durch das Auftreten von Kolloidkörperchen, Mikro- und Sphärolithen im Harn, die nach den genannten Autoren in kausalem Zusammenhang mit der Bildung von Harnkonkrementen stehen. Hirsch u. Voit (1954) gelang es durch parenterale Verabreichung von Periston-N, einer Substanz mit bekannter Schutzkolloidwirkung, das Auftreten von sulfonamidinduzierten Steinkrisen innerhalb der ersten 24 Std zu verhindern.

Diese Ergebnisse konnten nunmehr mit HS reproduziert werden: Während die Ratten der Kontrollgruppe die von Koch (l.c.) beschriebenen Symptome der Oxamid-Vergiftung zeigten und die Steinkrisen regelmäßig bereits in den ersten Harnportionen nach Beginn der Oxamid-Verabreichung auftraten, blieben diese in der mit HS behandelten Versuchstiergruppe innerhalb der ersten 24 Std aus. Darüber hinaus wurde noch ein signifikanter Einfluß auf die Überlebensdauer festgestellt, so zwar, daß sämtliche HS-behandelten Tiere eine 12tägige Oxamid-Vergiftung überlebten, während alle Kontrolltiere innerhalb der ersten Woche der Oxamid-Medikation eingingen. Anderseits gelang es durch HS nicht, die Konkrementbildung auf die Dauer zu unterdrücken, da bei der Obduktion alle Tiere Konkremente im Urogenitaltrakt aufwiesen und

auch sonst sehr einheitliche Sektionsbefunde lieferten. Klinisch kamen sämtliche Tiere unter urämischen Symtomen ad exitum; dabei ist allerdings zu beachten, daß es zur Entwicklung dieses Zustandsbildes bei den Kontrolltieren nach etwa einer Woche, bei den mit HS behandelten Tieren jedoch erst nach 2 Wochen täglicher Oxamid-Verabreichung kam. Es kann daher für die HS ein retardierender Einfluß auf die Ausbildung der Oxamid-Vergiftungssymptome angenommen werden.

Angeregt durch die Ergebnisse der HS-Behandlung bei Oxamid-Vergiftung, wurde nun der Einfluß von HS auf die Auswirkungen von Sulfonamid-Medikation in toxischen Dosierungen untersucht. Als Sulfonamid wurde Eubasin gewählt, von dem bekannt ist, daß es in einem hohen Prozentsatz zu Konkrementbildung im Urogenitaltrakt führt (Thaddea u. Zoloff 1943) und dessen mittlere letale Konzentration im Blut mit etwa 100 mg-% von den gebräuchlichen Sulfonamiden am niedrigsten liegt (Frisk 1943).

Wie in der Oxamid-Versuchsreihe wurde auch hier ein statistisch hoch gesicherter Einfluß der HS-Behandlung auf die Überlebenszeit, im Sinne einer Verlängerung derselben, festgestellt. Darüber hinaus zeigte sich in diesem Falle aber auch eine signifikant geringere Konkrementhäufigkeit in der mit HS behandelten Versuchstiergruppe.

Diese Diskrepanz zwischen der Eubasin- und der Oxamid-Versuchsreihe kann auf verschiedene Art erklärt werden. Sie kann bedingt sein durch die Verschiedenheit des Konkrementbildung auslösenden Agens, durch die höhere Dosierung der HS bei der Eubasin-Vergiftung, oder sie kann schließlich auf der unterschiedlichen Vergiftungsdauer beruhen: Eubasin wurde beiden Versuchstiergruppen einheitlich 5 Tage lang verabreicht, während Oxamid täglich bis zum Tod der Versuchstiere, also den unter HS-Behandlung stehenden Ratten 13 bzw. 14 Tage hindurch gegeben wurde. Diese Tiere waren somit einer wesentlich massiveren Schädigung ausgesetzt als diejenigen der Eubasin-Versuchsreihe.

Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse bezüglich des Einflusses von HS-Behandlung auf die Überlebenszeit und Konkrementhäufigkeit bei Eubasin-Vergiftung konnten von Satke-Eichler (1956) nicht reproduziert werden. Eine mögliche Erklärung ist darin zu sehen, daß bei jenen Versuchen auch in der Kontrolltiergruppe (ohne HS) nach 8tägiger Eubasin-Verabreichung noch kein Tier eingegangen war; worauf allerdings dieses unterschiedliche Verhalten der Ratten zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden.

Es bleibt noch das Verhalten des Rest-N im Verlaufe der Eubasin-Vergiftung zu besprechen. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, ergaben die Rest-N-Bestimmungen für die Gruppen A und C zwei deutlich verschiedene Kollektive mit jeweils geringen Streuungen um die Mittelwerte von 68 bzw. 52 mg-%. Demgegenüber zeigten die Rest-N-Werte der 5 mit HS behandelten, am 5. Tag der Eubasin-Medikation getöteten Tiere (Gruppe B) eine beträchtliche Streuung, so zwar, daß 2 Werte denen der Gruppe A, die als urämisch angesehen werden können, und 3 Werte den normalen, in der Gruppe C gefundenen, entsprechen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und der Anzahl der spontanen Todesfälle unter urämischen Symptomen ergibt sich folgende Gegenüberstellung der beobachteten Urämiehäufigkeiten in den beiden Versuchstiergruppen: $^{14}/_{15}$ in der Kontrollgruppe (ohne HS), $^{2}/_{15}$ in der Behandlungsgruppe (mit HS). Für ein solches Ereignis ist die Zufallswahrscheinlichkeit $P < 0{,}001$; somit ist die geringere Urämiehäufigkeit in der mit HS behandelten Versuchstiergruppe als statistisch hoch gesichert anzusehen.

In der nächsten Versuchsreihe sollte eine allfällige permeabilitätsbeeinflussende Wirkung von HS untersucht werden. Als schädigendes Agens wurde hierfür α-NTH verwendet, welcher bei entsprechender Dosierung innerhalb von wenigen Stunden, durch Erhöhung der Permeabilität der Lungencapillaren, zu pleuralen Ergüssen und Lungenödem führt (Baker 1954). Da die von Joffe (1954) angegebene Methode der Bestimmung des Flüssigkeitsgehaltes der Lungen sich als geeignet zur Beurteilung von Lungenödem erwiesen hatte (Wohlzogen et al. 1955), sollte auf diese Weise der Effekt von HS auf das α-NTH-induzierte Lungenödem geprüft werden.

Die Deutung der Ergebnisse dieses in zwei Serien angelegten Versuches (vgl. Tab. 4 und 5) ist insofern schwierig, als die Befunde der ersten Versuchsserie bei der Wiederholung nicht reproduziert werden konnten. Vielmehr ergab sich bei der varianzanalytischen Prüfung der Unterschied zwischen den Versuchsserien nicht nur als hoch gesichert, sondern als der dominierende Faktor gegenüber Behandlungs- und Geschlechtseinfluß. Eine mögliche Erklärung hierfür ist darin zu sehen, daß die 1. Versuchsserie im Frühjahr, die 2. jedoch im Sommer durchgeführt wurde; es könnten also die verschiedenen klimatischen Bedingungen mit dem erhöhten Flüssigkeitsgehalt der Lungen bei allen mit α-NTH vergifteten Versuchstiergruppen in ursächlichem Zusammenhang stehen. Zu beachten ist, daß sich dieser Effekt nur bei den männlichen Tieren in signifikanter Weise zeigte, während die Weibchen in beiden Versuchsserien auf α-NTH-Vergiftung annähernd gleich reagierten und bei ihnen die Zunahme des Lungenflüssigkeitsgehaltes durch HS praktisch unbeeinflußt blieb. Diese Annahme eines jahreszeitlich bedingten unterschiedlichen Verhaltens der Männchen gegenüber der lungenschädigenden Wirkung des α-NTH würde für eine Erklärung sämtlicher, in dieser Versuchsreihe erhaltenen Ergebnisse genügen. Wenn, in Analogie zu den Befunden bei der Oxamid- und Eubasin-Vergiftung, vorausgesetzt wird, daß eine gewisse Toleranzgrenze der Schädigung nicht überschritten werden darf, damit HS noch eine Wirkung zeigt, so müßte sich ein hemmender Effekt derselben auf das α-NTH-induzierte Lungenödem vor allem in jener Gruppe zeigen, deren zugehörige, nur mit α-NTH vergiftete Vergleichsgruppe die schwächste Schädigung, d. h. die

geringste Flüssigkeitszunahme der Lungen gegenüber der entsprechenden unbehandelten Kontrolltiergruppe aufweist. Dies trifft nun tatsächlich für die Gruppe „Versuchsserie 1, ♂" zu. Die mittlere Flüssigkeitszunahme der Lungen in der α-NTH vergifteten Gruppe im Vergleich zu der normalen Kontrolltiergruppe von 2,5% wurde hier durch HS-Behandlung fast vollständig kompensiert. Daß HS in den anderen Gruppen nur zu einer insignifikanten Hemmung der Flüssigkeitszunahme in den Lungen führte, könnte auf einer massiven, irreparablen Schädigung durch α-NTH in jenen Fällen beruhen.

Den Befunden der letzten Versuchsreihe, in der der Einfluß von HS-Behandlung auf experimentelle Uranyl-Vergiftung untersucht wurde, kommt wegen des geringen Tiermaterials nur eine kasuistische Bedeutung zu. Das Ergebnis war aber so auffällig, daß es dennoch mitgeteilt wurde.

Uransalze führen bei damit vergifteten Versuchstieren zu einer Störung des Lipoidstoffwechsels und einem hepato-renalen Syndrom mit nephrotischen Nierenveränderungen und Leberverfettung (Keller 1953). Das Vergiftungsbild zeigt Ähnlichkeiten mit den im Gefolge von Pankreasexstirpation auftretenden pathologischen Veränderungen (Dragstedt et al. 1936) und spricht ebenso auf Lipocaic an (Keller 1954).

Durch HS-Behandlung gelang es, die durch Uranylnitrat hervorgerufenen toxischen Leberschädigungen zu verhindern, ein Effekt, den Keller (loc. cit.) regelmäßig durch Lipocaic-Behandlung erzielte. Es erscheint nicht angebracht, auf Grund dieser Einzelbeobachtung Erwägungen über den Wirkungsmechanismus der HS bei Uranyl-induzierter Leberverfettung anzustellen; soviel erscheint jedoch sicher, daß es sich dabei nicht, wie beim Lipocaic, um eine direkte Beeinflussung des Lipoidstoffwechsels handelt.

Aus der Verschiedenheit der beobachteten Wirkungen von HS auf den Verlauf experimenteller Vergiftungen ergibt sich zusammenfassend: Die beschriebenen Effekte der HS sind nicht durch einen Wirkungsmechanismus allein erklärbar, sondern kommen durch das Zusammenwirken von zumindest zwei Komponenten — Schutzkolloid- und Permeabilitätswirkung — zustande. Ob daneben eine entgiftende Wirkung der HS, eventuell bedingt durch ihren hohen Glucoronsäuregehalt, in Frage kommt, läßt sich derzeit noch nicht entscheiden. Als ein wesentlicher Befund, der auch geeignet erscheint, verschiedene einander widersprechende Angaben in der Literatur zu erklären, ergab sich, daß durch HS offenbar nur Schädigungen, die eine bestimmte Toleranzgrenze nicht überschreiten, bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden können, während stärkere Schädigungen durch HS unbeeinflußbar sind.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von HS auf verschiedene experimentelle Vergiftungen bei Nagern untersucht. Die beobachteten Wirkungen, Verlängerung der Überlebenszeit (Oxamid- und Eubasin-Vergiftung), Verminderung der Konkrement- und Urämiehäufigkeit (Eubasin-Vergiftung), hemmender Einfluß auf die Ausbildung von Lungenödem

(α-NTH-Vergiftung) und auf die Parenchymschädigungen an der Leber (Uranyl-Vergiftung), lassen sich nicht durch einen einzigen Wirkungsmechanismus, z. B. Schutzkolloid- oder Permeabilitätswirkung der HS allein erklären. Die erhobenen Befunde deuten darauf hin, daß es unter oraler HS-Zufuhr zu einer Beeinflussung des HS-Hyaluronidase-Systems kommt, das eine zentrale Stellung im Stoffaustausch zwischen Blut, mesenchymaler Grundsubstanz und Körperzellen einnimmt. Mit dieser Annahme steht im Einklang, daß nur relativ leichte Schädigungen durch HS beeinflußbar sind. Der Effekt oraler HS-Verabreichung kann demnach, neben den hypothetisch zu erwartenden und experimentell bestätigten, auf Schutzkolloid- und Permeabilitätsbeeinflussung beruhenden Wirkungsmechanismen, in einer unspezifischen Wirkung gesehen werden, die dann nicht mehr in Erscheinung tritt, wenn Schädigungen eine bestimmte Toleranzgrenze überschreiten.

Literatur

Baker, S. P.: Anuria Produced by α-Naphtylthiourea. Amer. J. Physiol. **179**, 457 (1954). — Butt, A. J., and E. A. Hauser: The Importance of Protective Urinary Colloids in the Prevention and Treatment of Kidney Stones. Science (Lancaster, Pa.) **115**, 308 (1952a). — Butt, A. J., E. A. Hauser and J. Seifter: Effect of Hyaluronidase on the Urine and its Possible Significance in Renal Lithiasis. J. Amer. Med. Assoc. **150**, 1096 (1952b). — Dorfmann, A., and S. Schiller: The Metabolism of Mucopolysaccharides. Peaceful Uses of Atomic Energy: Proceedings of the International Conference in Geneva **12**, 1286 (1956). — Dragstedt, L. R., J. Prohaska and H. Harms: Observations on a Substance in Pancreas (a Fat Metabolizing Hormone) Which Permits Survival and Prevents Liver Changes in Depancreatized Dogs. Amer. J. Physiol. **117**, 175 (1936). — Frisk, A. R.: Sulfonilamid Derivates. Acta med. scand. (Stockh.) Suppl. 142 (1943). — Hirsch, H. H., u. E. Voit: Experimentelle Untersuchungen über die Verhinderung der Harnsteinbildung durch Schutzkolloidvermehrung im Harn. Klin. Wschr. **1954**, 651. — Joffe, M. H.: A Method of Assessing Experimental Pulmonary Edema. Science (Lancaster, Pa.) **129**, 612 (1954). — Keller, H. M.: Blutcholesterin, Albuminurie und histologische Veränderungen bei einer chronischen Vergiftung mit Urannitrat an Kaninchen. Helvet. med. Acta **20**, 157 (1953). — Einfluß von Lipocaic auf die experimentelle Urannephrose beim Kaninchen. Schweiz. med. Wschr. Beiheft zu Nr. 2, 81 (1954). — Koch, F. E.: Experimentelle Untersuchung über die Nierensteinbildung. Z. Urol, Sonderheft, 110 (1950). — Satke-Eichler, I.: Persönliche Mitteilung (1956). — Thaddea, S., u. R. Zoloff: Experimentelle Untersuchungen über Steinbildung in den Harnwegen nach Sulfonamidzufuhr. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 249 (1943). — Voit, E., u. H. H. Hirsch: Untersuchungen mit Hyaluronidase, Hyaluronsäure und Dextran zur Stabilisierung des Urins. Klin. Wschr. **1955**, 806. — van der Waerden, B. L. u. E. Nievergelt: Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels X-Test und Zeichentest. Berlin: Springer 1956. — Wohlzogen, F. X.: Hyaluronidase bei experimenteller Oxalurie. Wien klin. Wschr. **1952**, 562. — Wohlzogen, F. X., u. W. Brandstetter: Beeinflussung von Harnsedimenten durch Hyaluronsäure. Wien. klin. Wschr. **1953**, 227. — Wohlzogen, F. X., E. Kiesewetter u. W. Brandstetter: Eine Methode zur quantitativen Beurteilung des Lungenödems. Deutscher Physiolog. Kongreß Graz 1955.

Dozent Dr. F. X. Wohlzogen,
Physiologisches Institut d. Univ. Wien/Österreich IX, Schwarzspanierstr. 17

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 199—210 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens)

Die Substanz P-Konzentration im Gehirn bei verschiedenen Funktionszuständen des Zentralnervensystems*

Von
Gerhard Zetler und Gerta Ohnesorge**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. März 1957)

Substanz P (SP), das von Euler u. Gaddum (1931) erstmals beschriebene pharmakologisch aktive Polypeptid, scheint für die Funktion des Gehirns von Bedeutung zu sein. SP kommt nicht nur in einer charakteristischen Verteilung im Gehirn vor (Kopera u. Lazarini 1953; Lembeck 1953; Pernow 1953; Zetler u. Schlosser 1953, 1954, 1955; Amin, Crawford u. Gaddum 1954), sondern sie übt auch bei der Zufuhr von außen einen Einfluß auf die Funktion des Zentralnervensystems aus, den man vielleicht hemmend nennen könnte (Euler u. Pernow 1954, 1956; Zetler 1956a, b; Stern u. Hukovic 1956).

Es interessierte uns nun die Frage, ob die Konzentration von SP im Gehirn sich mit der Funktion des Organs ändert. Für viele im Gehirn vorkommende Substanzen trifft dies zu. Wir erwähnen nur die Abhängigkeit der Acetylcholin-Konzentration vom Funktionszustand des Gehirns. Bisher ist erst eine Arbeit erschienen, die sich mit der Beziehung zwischen der cerebralen Konzentration von SP und der Funktion des Gehirns befaßt (Paasonen u. Vogt 1956); es fand sich keine Änderung der SP-Konzentration im Nucleus caudatus und im Hypothalamus bei der Einwirkung von Pharmaka, die den Gehalt der gleichen Gebiete an Serotonin veränderten.

Wir stellten uns die Aufgabe, das Zentralnervensystem von Mäusen auf pharmakologischem Wege zu erregen oder zu lähmen und zu untersuchen, ob diese Maßnahmen einen Einfluß auf die SP-Konzentration im Gehirn haben. Ein solches Vorgehen, bei dem zentrale Stimulantien und Narkotica angewandt werden, hatte sich anderen Autoren bewährt bei Untersuchungen über das Vorkommen und Verhalten von Ammoniak und Acetylcholin im Gehirn (Literatur siehe Diskussion).

* Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Frl. Ohnesorge wird unsere Ergebnisse ausführlich in ihrer Dissertation darstellen.

Material und Methoden

Den Gehalt der Hirnextrakte an SP bestimmten wir am isolierten Ileum des Meerschweinchens nach Amin, Crawford u. Gaddum (1954); das Darmstück war in 2 ml Tyrode-Lösung suspendiert. Diese Lösung enthielt in 1 l destillierten Wassers 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g $CaCl_2$, 1,0 g Dextrose, 0,05 g NaH_2PO_4 und 1,0 g $NaHCO_3$; die Temperatur betrug 32° C. Bei dem isolierten Kaninchen-Jejunum enthielt die Tyrode-Lösung außerdem noch 0,1 g $MgCl_2$; die Temperatur dieses Bades war 37° C. Um den Meerschweinchen-Darm für Acetylcholin, Histamin und 5-Oxytryptamin (Serotonin) unempfindlich zu machen, enthielt die Lösung 10^{-7} Atropin, 10^{-6} Neo-Antergan und $2 \cdot 10^{-5}$ Tryptamin. Bei dem Kaninchen-Jejunum enthielt die Tyrode-Lösung nur Atropin und Neo-Antergan in obiger Konzentration. Das Standard-Präparat von SP war aus Rindergehirn hergestellt und hatte eine Aktivität von 8,5 E/mg; nach Pernow (1953) entspricht eine SP-E der Wirksamkeit von 7—10 SP-Schwellendosen am isolierten Ileum des Meerschweinchens in 3 ml Tyrode-Lösung.

Wir untersuchten die Gehirne von männlichen Mäusen, die 20—25 g schwer waren. Die Mäuse wurden schnell mit der Schere dekapitiert und das Gehirn entnommen. Die caudale Grenze war die Spitze des Calamus scriptorius; das Cerebellum wurde verworfen, da es praktisch frei von SP ist. Die Gehirne wurden dann gewogen und in einem Mörser mit etwas Seesand zermahlen. Von der Dekapitation bis zu diesem Zeitpunkt verging nicht mehr als 1 min.

Die bisher angewandten Methoden zur Extraktion von SP aus Gewebe, etwa Nervengewebe, bestehen im wesentlichen darin, daß das Gewebe mit saurer wäßriger Extraktionslösung zerrieben und dann für wenige Minuten gekocht wird. Diese Art der Extraktion ist aber möglicherweise schon eine sehr eingreifende Maßnahme, durch die beispielsweise freies Acetylcholin aus der im Nervengewebe vorliegenden gebundenen und biologisch unwirksamen Form in Freiheit gesetzt wird (Übersicht bei Loewi 1956). Es ist prinzipiell möglich, daß auch bei der bisher geübten Art der Extraktion von SP ähnliche Vorgänge unbemerkt ablaufen, die freilich nichts mit einer Zerstörung von SP zu tun haben; SP ist bekanntlich gegen Kochen in saurem Milieu sehr resistent. Wir fragten uns deshalb, ob es nicht möglich sei, SP mit milderen Methoden, also ohne Anwendung von Säure und Hitze zu extrahieren. Eine Beachtung dieser Fragen wäre deshalb wichtig, weil die an den nervösen Prozessen aktuell beteiligte Menge von SP vielleicht leichter zu extrahieren ist als eine physiologischerweise noch unwirksame Depotform dieser Substanz; dies scheint bei Acetylcholin der Fall zu sein.

Wir zerrieben deshalb die Gehirne, die nach der Entfernung des Cerebellums durchschnittlich 360 mg wogen, mit etwas Seesand im Mörser und setzten 3 ml destillierten Wassers zu. Um inertes Eiweiß nach Möglichkeit auszufällen, gaben wir 9 ml 96%igen Äthylalkohols zu. Nach 5 min langem Zentrifugieren mit 3200 U/min wurde das Überstehende abgetrennt, auf dem Wasserbade eingedampft und die Tyrode-Lösung aufgenommen. Dieser Extrakt a_1 hatte eine Aktivität von etwa 56 E/g Gehirn (Feucht-Gewicht). Um zu sehen, ob diese Extraktion des Gehirns vollständig war, nahmen wir den nach dem Zentrifugieren zurückgebliebenen Rückstand erneut in destilliertem Wasser auf und verfuhren wie bei der Herstellung von Extrakt a_1. Wie die Tab. 1 zeigt, hatte der so gewonnene Extrakt a_2 noch eine Aktivität entsprechend 14 E/g Gehirn. Wir wiederholten deshalb diese Art der Extraktion noch zweimal (Extrakte a_3 und a_4). Nachdem wir das Gehirn auf diese Weise viermal nacheinander kalt extrahiert hatten, suspendierten wir es wieder in 3 ml destillierten Wassers, brachten die Suspension mit n HCl auf p_H 3, stellten sie 2 min in kochendes Wasser, gaben nach dem Abkühlen 9 ml Äthanol zu, verminderten die Acidität durch Zufügen von n NaOH bis zum Ausfallen der

Eiweißkörper (p_H 6) und zentrifugierten für 2 min mit 3000 U/min. Das Überstehende lieferte nach dem Eindampfen auf dem Wasserbade und nach der Aufnahme in Tyrode-Lösung den Extrakt b_1. Auf diese Weise ließ sich noch SP extrahieren, die mit der „milden" kalten Methode nicht zu fassen war. Aber auch die einmalige heiße Extraktion war noch nicht erschöpfend; eine Wiederholung lieferte immer noch etwas SP (Extrakt b_2). Insgesamt enthielt das Gehirn der Maus (ohne Cerebellum) etwa 92 E/g SP, wovon 76 E/g bereits durch viermalige kalte Extraktion gewonnen werden konnten.

Tabelle 1. *Ergebnisse der sechsmal nacheinander erfolgenden Extraktion von SP aus 6 Gehirnen von Mäusen, wobei die ersten 4 Extraktionen (a-Extrakte) bei Raum-Temperatur mit destilliertem Wasser und Äthanol, die beiden folgenden Extraktionen (b-Extrakte) bei p_H 3 und 100° C vorgenommen wurden. Die Zahlen bedeuten die pro Gramm frischen Gehirns extrahierte Menge SP in Einheiten (E/g)*

Gehirn Nr.	a-Extrakte				b-Extrakte	
	a_1	a_2	a_3	a_4	b_1	b_2
1	58	7,5	4,7	1,0	8,6	1,2
2	46	16,0	3,4	3,0	10,0	1,7
3	67	18,0	9,3	1,4	23,0	5,0
4	50	16,0	6,0	2,0	14,6	1,0
5	58	14,0	4,7	1,0	18,0	0,8
6	54	9,6	3,0	2,4	10,0	1,0
Mittel . .	55,5	13,5	5,2	1,8	14,0	1,8
			76,1		15,8	
			91,9			

Zur Kontrolle extrahierten wir 20 Gehirne mit einer Extraktionslösung, die zu gleichen Teilen aus destilliertem Wasser und Methanol bestand und mit H_2SO_4 auf p_H 2—3 gebracht worden war (Zetler u. Schlosser 1954). Das in dieser Lösung zerriebene und suspendierte Gehirn extrahierten wir nur einmal, indem wir die Suspension auf dem Wasserbade zweimal kurz aufkochen ließen, filtrierten, das Filtrat eindampften und den Rückstand in Tyrode-Lösung aufnahmen. Die so untersuchten 20 Gehirne enthielten im Mittel 97 E/g SP, also fast die gleiche Konzentration wie nach der in Tab. 1 dargestellten sechsmaligen Extraktion.

Die von uns angewandte fraktionierte Extraktion von SP lieferte demnach zwar keine größere Ausbeute, aber sie bot möglicherweise gewisse Anhaltspunkte für das Vorliegen zweier Zustandsformen von SP im Gehirn. Um an dieses Problem heranzugehen, haben wir frische Gehirne von Mäusen zerrieben, in 3 ml destillierten Wassers suspendiert und diese Suspension vor der oben beschriebenen weiteren Extraktion dialysiert oder autolysiert. Bei diesen Versuchen, die wir unter verschiedenen Bedingungen durchführten, verhielten sich die b-Extrakte immer ganz anders als die a-Extrakte. Wir wollen diese Ergebnisse jetzt noch nicht ausführlich publizieren, da wir sie ohne weitere Experimente noch nicht befriedigend deuten können.

Es schien uns auf Grund dieser Beobachtungen ratsam, die umständliche fraktionierte Extraktion von SP beizubehalten. Allerdings vereinigten wir bei allen weiteren Versuchen die 4 a-Extrakte vor dem Eindampfen auf dem Wasserbad, dasselbe geschah mit den beiden b-Extrakten. Auf diese Weise erhielten wir von jedem Gehirn einen a-Extrakt und einen b-Extrakt.

Die endgültigen, in Tyrode-Lösung aufgenommenen Extrakte waren trübe, was wohl auf in Wasser unlösliche Lipoide zurückzuführen ist. Eine Reinigung der Extrakte gelang uns, indem wir den trüben Extrakten Aceton bis zum Auftreten reichlicher Fällung zusetzten und zentrifugierten. Nach dem Eindampfen des Überstehenden auf dem Wasserbade, der Aufnahme des Rückstandes in destilliertem Wasser und dem erneuten Zentrifugieren ergaben sich klare Extrakte. Leider hatten die gereinigten a-Extrakte nur noch 64% der Aktivität der rohen Extrakte, weshalb wir weiterhin auf diese Reinigung verzichteten.

Alle den Mäusen injizierten Pharmaka wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und in einem Volumen von 0,01 ml/g den Tieren teils subcutan, teils intraperitoneal verabreicht.

Lysergsäurediäthylamid (LSD): Wir injizierten 10 mg/kg subcutan. Schon wenige Minuten nach der Injektion begann der Erregungszustand, der bei der 60 min später erfolgenden Tötung der Tiere nicht mehr in voller Stärke vorhanden war. — Pikrotoxin: Wir gaben 6 mg/kg subcutan, wonach von 9 Tieren 7 spontan 8, 5, 9, 12, 13, 15, 18 und 20 min später starben. Die beiden überlebenden Tiere hatten je 3 schwere Krampf-Anfälle und wurden 30 min nach der Injektion getötet. — Benzedrin (Amphetamin = d-l-1-Phenyl-2-aminopropan): Die Mäuse erhielten 10 mg/kg subcutan und wurden 40 min nach der Injektion dekapitiert. — Morphin: Wir verabreichten 15 mg/kg subcutan, wonach es zu einer starken Steigerung der Motilität und zum Auftreten des Straub'schen Phänomens kam. 60 min nach der Injektion wurden die Tiere getötet. — Urethan: Nach der intraperitonealen Gabe von 1,6 g/kg kam es mit Sicherheit zur Narkose (Seitenlage). Nach 30 min langer Narkose dekapitierten wir die Tiere. — Luminal-Natrium (Natrium phenyläthylbarbituricum): 175 mg/kg intraperitoneal führten zunächst zu einem Excitationsstadium, das 15—20 min lang dauerte. Nach 30 min langer Narkose töteten wir die Tiere. — Chloroform: Wir narkotisierten die Mäuse in Glasflaschen von 5 l Inhalt, in die auf einen Wattebausch 0,134 ml Chloroform gegeben wurde. Das Excitationsstadium dauerte 10—30 min. Nach 30 min langer Narkose wurden die Tiere dekapitiert.

Die Mittelwerte wurden unter der Anwendung der t-Funktion miteinander verglichen. Wir nahmen an, daß kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Werten besteht, wenn $p > 0{,}05$ ist. Der in den Tabellen angegebene Wert ε ist der Mittlere Fehler des Mittelwertes.

Ergebnisse

Da die von uns angewandte kalte Extraktion mit destilliertem Wasser von den üblichen Verfahren abweicht, erhob sich die Frage, ob die biologische Aktivität der so gewonnenen Extrakte wirklich auf SP zurückzuführen ist. Nach allen Erfahrungen sind die von uns am isolierten Meerschweinchen-Ileum angewandten Konzentrationen von Atropin, Neo-Antergan und Tryptamin hoch genug, um jede Störung durch gleichfalls extrahiertes Acetylcholin, Histamin und Serotonin unmöglich zu machen. Unter diesen Bedingungen der Auswertung kann das wirksame Agens in einem Extrakt aus Gehirn nur noch SP oder die im Zwischenhirn vorkommenden Hypophysenhinterlappen-Hormone (Hild u. Zetler 1951) sein. Diese Hormone kommen hier jedoch in so geringer Menge vor, daß sie bei der Auswertung eines Extraktes aus einem ganzen Gehirn auf SP am Meerschweinchen-Ileum nicht stören können (Amin, Crawford u. Gaddum 1954). Trotzdem versuchten wir, SP nach der

Methode von GADDUM (1953) zu identifizieren, indem wir den isolierten Darm durch eine genügend hohe Konzentration von SP in der Suspensionslösung für SP desensibilisierten. Nach den Erfahrungen von GADDUM (1953), AMIN, CRAWFORD u. GADDUM (1954) sowie PAASONEN u. VOGT (1956) spricht der Darm während der Anwesenheit hoher Konzentrationen von SP in der Suspensionsflüssigkeit auf geringere, vorher

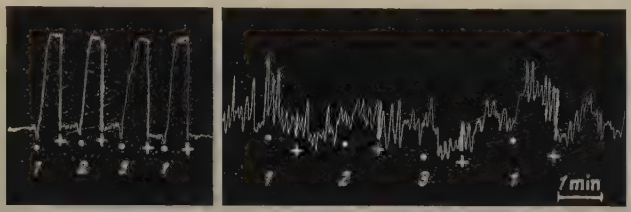


Abb. 1. Einfluß der Desensibilisierung des Meerschweinchen-Ileums gegen SP auf die Wirksamkeit äquipotenter Gaben von SP-Standard (*1*), a-Extrakt (*2*) und b-Extrakt (*3*) aus Gehirn. Bei der zweiten Abbildung enthält die Suspensionslösung dauernd die 10fache SP-Menge, nämlich 3,2 E/ml, bezogen auf die Standard-Dosis (*1*). + = Erneuerung der Suspensionslösung und Anhalten des Kymographions für 5 min

wirksame Dosen nicht mehr an, ohne jedoch gleichzeitig seine Empfindlichkeit für andere aktive Substanzen zu verlieren. Am so desensibilisierten Darm (Abb. 1) verhielten sich die beiden Hirn-Extrakte a und b wie der SP-Standard.

Da SP als Polypeptid durch Trypsin und Chymotrypsin zerstört wird, versuchten wir, auch unsere Extrakte durch Trypsin abzubauen.

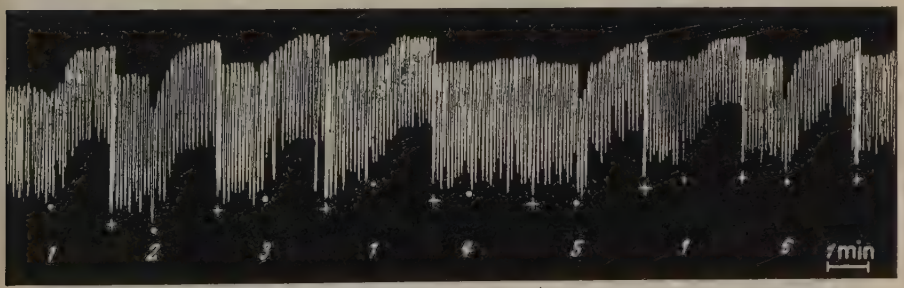


Abb. 2. Kaninchen-Jejunum (Suspensionslösung 8 ml). *1* SP-Standard 1,7 E. *2* a-Extrakt; *3* b-Extrakt; *2* und *3* in einer Dosis, die am Ileum des Meerschweinchens 1,7 E SP äquivalent war. *4* und *5* wie *3* und *2*, jedoch nach der Inkubation mit Trypsin. *6* wie *5*, jedoch in einer am Ileum des Meerschweinchens dem SP-Standard äquivalenten Dosis

Wir benutzten Trypsin/Merck (Aktivität mindestens 40000 Fuld-Groß-E/g). Die in Ampullen eingeschmolzenen Ansätze inkubierten wir in einem Wasserbade von 38° C und stellten sie nach dem Ende der Inkubation 30 min lang in kochendes Wasser. Zu unserer Überraschung zeigte sich (Tab. 2), daß zwar Lösungen unseres Standard-SP-Präparates ebenso wie b-Extrakte gleicher Aktivität restlos abgebaut wurden, daß

dies aber nicht bei den a-Extrakten gelang (Abb. 2). Hier betrug der Verlust an Aktivität etwa 70%, ganz gleich, ob die Dauer der Inkubation verlängert oder die Trypsin-Konzentration erhöht worden war. An dem gegen SP desensibilisierten Meerschweinchen-Ileum ergab sich nun (Abb. 3), daß offenbar eine neue Substanz in den a-Extrakten durch die Behandlung mit Trypsin entstanden war. Der mit Trypsin inkubierte a-Extrakt (der erste in Tab. 2) war nämlich am für SP desensibilisierten Ileum noch wirksam, obwohl der nicht mit Trypsin behandelte gleiche

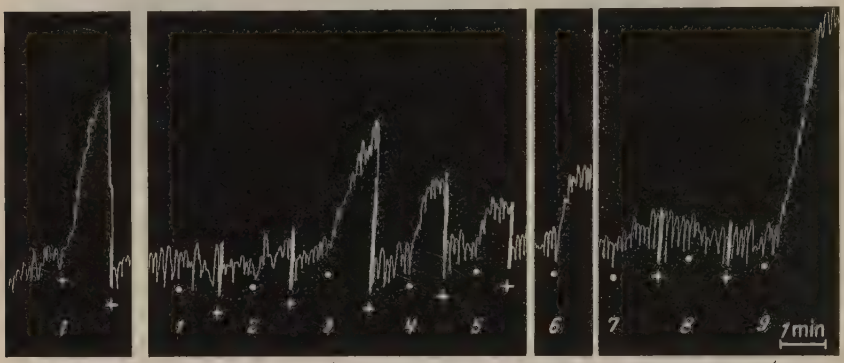


Abb. 3. Isoliertes Ileum des Meerschweinchens. *1* SP-Standard 0,26 E (Endkonzentration: 0,13 E/ml), Bei Bild B enthält die Suspensionslösung dauernd die 20fache SP-Konzentration, nämlich 2,6 E/ml. *2* ohne Trypsin inkubierter a-Extrakt; *3* der gleiche Extrakt mit Trypsin inkubiert (*2* und *3* wurden in Dosen gegeben, die dem 1,5fachen des Standards äquivalent waren). *4* und *5* wie *2* und *1*, jedoch in doppelter Menge. *6* wie *3*, jedoch in halber Menge. *7* Trypsin 0,14 mg, 30 min auf 100° C erhitzt (zugesetzte Menge entsprechend *6*). *8* wie *7*, jedoch 0,27 mg. *9* Trypsin 0,27 mg, jedoch nicht erhitzt

a-Extrakt, der ja am normalen Ileum um 44% aktiver war als der Trypsin-behandelte, nicht mehr wirkte. Die Abb. 3 zeigt, daß die Desensibilisierung gegen SP nur dazu ausreichte, um die SP-Standard-Dosis in Bild A und die äquipotente Dosis des normalen a-Extraktes unwirksam zu machen; die doppelten Dosen waren wieder wirksam. Wie man sieht, wirkte bei dem vorliegenden Grade der Desensibilisierung die halbe Dosis des mit Trypsin behandelten a-Extraktes etwa gleich stark wie die doppelte Dosis des normalen a-Extraktes. Nach dieser Art der Auswertung hatte sich die biologische Wirksamkeit des a-Extraktes durch die Behandlung mit Trypsin scheinbar etwa vervierfacht.

Aus diesen Versuchen möchten wir schließen, daß die a-Extrakte normalerweise nur SP enthalten, daß durch die Behandlung mit Trypsin der SP-Gehalt zerstört, gleichzeitig aber eine neue Substanz gebildet wird. Diese Substanz wirkt auch am gegen SP desensibilisierten Meerschweinchen-Ileum und am Kaninchen-Jejunum. Sie ist naturgemäß resistent gegen Trypsin und Chymotrypsin, das ja in unserem Trypsin-Präparat enthalten ist.

Tabelle 2. *Versuche zum Abbau von SP durch Trypsin*

Substrat	Trypsin-Konzentration in mg/ml	Dauer der Inkubation in min	Aktivität nach Inkubation ohne Trypsin E/ml	Aktivität nach Inkubation mit Trypsin E/ml	Abbau in %	
SP-Standard-Präparat . .	1	30	2,6	< 0,07	> 97	
a-Extrakte	1	30	2,5	1,4	44	
	1	30	2,14	0,63	70	
	1	30	2,43	0,62	74	
	1	45	2,04	0,48	76	69
	1	45	1,94	0,55	72	
	2	30	5,1	0,85	83	
	2	30	3,4	1,25	63	
b-Extrakt . .	1	30	2,4	< 0,085	> 96	

Nachdem wir uns auf diese Weise davon überzeugt hatten, daß wir durch unsere Arbeitsweise wirklich nur SP erfaßten, untersuchten wir die Gehirne von 14 normalen Mäusen (Tab. 3). Insgesamt ließen sich 88 E/g SP extrahieren, während das fraktionierte Vorgehen (Tab. 1) 92 E/g lieferte.

Tabelle 3. *Konzentration von SP im Gehirn (ohne Cerebellum) der normalen Maus*

Gehirn Nr.	a-Extrakt E/g	b-Extrakt E/g
1	79	16
2	98	14
3	51	13
4	34	16
5	83	18
6	75	22
7	73	21
8	54	20
9	49	20
10	75	16
11	90	19
12	72	12
13	75	15
14	91	14
Mittel: . .	71,4	16,9
$\pm \varepsilon$: . . .	4,86	0,845

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, ändert sich die SP-Konzentration im Gehirn bei der Einwirkung bestimmter Pharmaka auf das Zentralnervensystem. Diese Änderungen, die sowohl bei den a-Extrakten wie auch bei den b-Extrakten auftraten, waren zum Teil ganz erheblich; so betrug die stärkste Abnahme bei den a-Extrakten 48% (Luminal) und bei den b-Extrakten 44% (Pikrotoxin), die stärkste Zunahme bei den a-Extrakten 78% (Morphin). Diese Änderungen können schon nach relativ kuzer Zeit eintreten, wie man am Beispiel des Pikrotoxins erkennen kann (2 Tiere starben schon 8,5 und 9 min nach der Injektion).

Bei den a-Extrakten zeigte sich ein klarer Gegensatz zwischen den Narkotica und den Stimulantien, da die SP-Konzentration in der Narkose unter die Norm sank, bei der Stimulierung des Gehirns

jedoch über die Norm anstieg. Unter den erregenden Substanzen bildete LSD eine Ausnahme, da sich der SP-Gehalt der a-Extrakte nicht änderte. Gerade nach LSD hätte man vielleicht einen Anstieg der SP-Konzentration erwarten können, da Krivoy (zitiert nach Gaddum 1956) beobachtet hatte, daß LSD in vitro ein im Gehirn vorkommendes Ferment hemmt, das SP abbaut.

Tabelle 4. *Einfluß von zentral erregenden Substanzen und von Narkotica auf die SP-Konzentration im Gehirn*

t bedeutet bei den Stimulantien die Zeit von der Injektion der Substanz bis zum spontanen Exitus oder zur Dekapitation der Tiere, bei den Narkotica die Dauer der Narkose

Pharmakon	n	*t* min	a-Extrakt E/g	$\pm s$	b-Extrakt E/g	$\pm s$	a+b Total-Extrakt E/g	$\pm s$
—	14	—	71,4	4,86	16,9	0,845	88,2	4,89
Pikrotoxin. .	9	~17	87,9[2]	5,74	9,5[3]	1,06	97,3[1]	5,62
Benzedrin. .	9	40	101,4[4]	4,5	9,9[4]	1,07	111,3[3]	5,02
Morphin . .	6	60	127,0[4]	7,04	14,7[1]	1,17	141,7[4]	8,23
LSD	11	60	70,6[1]	2,53	10,0[4]	1,15	80,6[1]	2,8
Chloroform .	8	30	51,5[3]	1,69	11,9[3]	1,11	63,4[4]	2,32
Urethan. . .	8	30	44,2[4]	2,14	14,7[1]	1,26	59,0[4]	5,13
Luminal-Na .	6	30	36,8[4]	2,58	14,5[2]	0,548	51,3[4]	2,8

[1] $p > 0{,}05$; [2] $p < 0{,}05$; [3] $p < 0{,}01$; [4] $p < 0{,}001$.

Ein Unterschied zwischen erregenden und lähmenden Pharmaka trat bei den b-Extrakten nicht in Erscheinung, da diese Extrakte fast immer an Wirksamkeit verloren. Somit änderte sich die Aktivität der a- und b-Extrakte im allgemeinen bei den Narkotica gleichsinnig und bei den Stimulantien gegensinnig. Das Beispiel des Pikrotoxins zeigt, daß sich diese gegensinnigen Änderungen aufheben können: Hier änderte sich die Gesamt-Konzentration von SP im Gehirn nicht, obwohl oder gerade weil sich die Aktivität der a- und b-Extrakte in verschiedenem Sinne änderte. Bei der ausschließlichen Untersuchung der Gesamt-Konzentration von SP hätte man einen Einfluß von Pikrotoxin auf den SP-Stoffwechsel des Gehirns nicht erkennen können. Ähnliches gilt auch für LSD, da sich hiernach zwar nicht die Gesamt-Konzentration von SP, wohl aber die Aktivität des b-Extraktes änderte.

Diskussion

Auf Grund der dargestellten Ergebnisse möchten wir die Frage aufwerfen, ob SP im Gehirn in zwei verschiedenen Zustandsformen vorliegt. Dafür könnten die Unterschiede im Verhalten der a- und b-Extrakte bei

der Extraktion und bei der Einwirkung von Pharmaka auf das Zentralnervensystem sprechen; dies gilt sehr wahrscheinlich auch für die Ergebnisse unserer nicht näher geschilderten Autolyse- und Dialyse-Versuche. Im Hinblick auf dieses Problem halten wir unsere Versuche nur für eine erste Orientierung. Wir glauben nämlich nicht, daß die von uns angewandte Methode der Extraktion die günstigste ist. So ist bei der Gewinnung der a-Extrakte die Extraktion im hypotonen, alkoholischen Milieu sicher schon eine differente Maßnahme, die zum Beispiel aus dem im Gehirn hauptsächlich vorhandenen gebundenen und damit biologisch unwirksamen Acetylcholin freies, biologisch aktives Acetylcholin in Freiheit setzen kann (siehe Loewi 1956). Deshalb können wir auch an Hand unserer Resultate noch nicht sagen, daß SP etwa wie Acetylcholin im Gehirn in einer freien (a-Extrakt) und einer gebundenen Form (b-Extrakt) vorkommt.

Wir glauben, daß wir eine neue Substanz beobachtet haben, die auf das isolierte Meerschweinchen-Ileum und Kaninchen-Jejunum auch dann noch kontrahierend wirkt, wenn der Darm nicht mehr für Histamin, Acetylcholin, Serotonin und SP empfindlich ist. Da diese Substanz erst nach der Einwirkung von Trypsin auf a-Extrakte, also nach einem Eiweiß abbauenden Prozeß erscheint, kann sie schwerlich ein Eiweißkörper sein; dagegen könnte sie der Nucleotid- oder Lipoid-Rest eines Nucleoproteid-, Lipoproteid- oder Proteolipid-Moleküls sein. Bekanntlich haben bestimmte Lipoid-Bestandteile eine kontrahierende Wirkung auf isolierte Därme (Übersicht: W. Vogt 1957). Zunächst jedoch wird es nötig sein, durch weitere Versuche den Unterschied zwischen dieser neuen Substanz und SP zu sichern.

Eine Abhängigkeit der cerebralen SP-Konzentration von der Funktion des Gehirns ist nicht verwunderlich, da zwischen dem Eiweiß-Stoffwechsel und der Aktivität des Zentralnervensystems enge Beziehungen zu bestehen scheinen. Allerdings ist bisher nur wenig über diese Verhältnisse bekannt; so schreibt Waelsch (1953): „Histopathologische Studien deuten auf eine relativ hohe Geschwindigkeit des Eiweiß-Stoffwechsels hin, während die spärlichen Versuche mit Isotopen uns eher an einen langsamen Stoffwechsel glauben lassen.“ Vielleicht bietet die Untersuchung des SP-Stoffwechsels einen relativ bequemen Zugang zu dem größeren Gebiete des Eiweiß-Stoffwechsels im Zentralnervensystem.

Eine Abhängigkeit der SP-Konzentration im Gehirn von der Funktion des Organs wäre auch deshalb von Interesse, weil SP bei der Zufuhr von außen die Funktion des Zentralnervensystems beeinflußt (siehe Einleitung). Unsere Befunde unterstützen wohl die Ansicht, daß SP für die Funktion des Zentralnervensystems von physiologischer Bedeutung ist. Die a-Extrakte, die die Hauptmenge der im Gehirn vorhandenen SP

enthalten, nahmen in der Narkose an Aktivität ab und bei der Erregung des Gehirns zu. SP verhält sich damit etwa ebenso wie NH_3 (Richter u. Dawson 1948; Torda 1953) und umgekehrt wie Acetylcholin (Tobias, Lipton u. Lepinat 1946; Richter u. Crossland 1949; Elliott, Swank u. Henderson 1950; Herken u. Neubert 1953). Man könnte denken, daß in der Narkose mehr SP verbraucht als gebildet und bei Erregung des Gehirns weniger SP verbraucht als gebildet wird; nach Gaitonde u. Richter (1956) ist in der Äther- und Barbiturat-Narkose die Aufnahme von S^{35} in die Gehirn-Proteine deutlich verlangsamt. Es ist auffallend, daß die b-Extrakte sowohl bei der Narkose wie bei der Erregung des Gehirns an Aktivität verlieren; darin unterscheiden sie sich grundlegend von den a-Extrakten. Die gesonderte Auswertung der a- und b-Extrakte war demnach wohl gerechtfertigt. Dies um so mehr, als bei der alleinigen Beobachtung der SP-Aktivität von Total-Extrakten aus Gehirn eine Veränderung des SP-Stoffwechsels unter Umständen nicht erkannt werden könnte, wie dies aus unseren Versuchen mit Pikrotoxin und LSD hervorgeht.

Angesichts unserer Ergebnisse fragen wir uns, warum Paasonen u. Vogt (1956) keine Abhängigkeit der SP-Konzentration vom Funktionszustand gefunden haben. Diese Autoren injizierten bei jungen und erwachsenen Hunden Benzedrin, Ephedrin, Insulin, β-Tetrahydronaphthylamin, Coffein und Reserpin und bestimmten die Konzentration von SP und Serotonin im Hypothalamus und Nucleus caudatus. Ephedrin, Benzedrin, Insulin und Coffein wurden auf 2 Dosen verteilt, die im Abstand von 2 Std subcutan injiziert wurden. Zwischen 4½ und 5 Std nach der ersten Injektion wurden die Hunde anaesthesiert und durch Entbluten getötet. Da nach unseren Beobachtungen Narkotica auf das Verhalten der SP-Konzentration umgekehrt wie Stimulantien wirken, wäre es möglich, daß in den Versuchen von Paasonen u. Vogt die finale Narkose die vorangegangene Einwirkung der Stimulantien auf den SP-Stoffwechsel neutralisierte. Wir wissen allerdings bisher nicht, ob dies tatsächlich möglich ist. Paasonen u. Vogt haben die Gesamt-Konzentration von SP im Nucleus caudatus und Hypothalamus bestimmt; wie wir an unserem Pikrotoxin- und LSD-Beispiel sahen, kann bei diesem Vorgehen unter Umständen eine Änderung des SP-Stoffwechsels verborgen bleiben. In den Versuchen von Paasonen u. Vogt war die zwischen der Gabe der Pharmaka und der Tötung der Tiere verstrichene Zeit wesentlich länger als bei uns. Schließlich untersuchten wir abgesehen vom Cerebellum das ganze Gehirn, obige Autoren nur zwei Partien. Alle diese Momente können dazu beitragen, daß unsere Beobachtungen nicht mit denen von Paasonen u. Vogt übereinstimmen.

Zusammenfassung

Es wurde versucht, Substanz P aus dem Gehirn von Mäusen möglichst vollständig zu extrahieren, und die im Gehirn vorliegende Konzentration dieses Polypeptids zu bestimmen. Substanz P scheint im Gehirn in zwei Fraktionen vorzukommen, die sich bei der Extraktion, der Autolyse, der Dialyse und bei der Änderung des Funktionszustandes des Zentralnervensystems verschieden verhalten.

Die Konzentration von Substanz P im Gehirn war von der Aktivität des Organs abhängig: In der Narkose sank die Konzentration unter die Norm, bei zentraler Erregung stieg sie über die Norm an.

Es hat den Anschein, daß eine darmerregende Substanz durch Trypsin aus einer aus Gehirn extrahierbaren Vorstufe in Freiheit gesetzt wird. Diese Substanz kann nicht Histamin, Acetylcholin, 5-Oxytryptamin (Serotonin) und Substanz P sein.

Literatur

Amin, A. H., T. B. B. Crawford and J. H. Gaddum: The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. J. of Physiol. **126**, 596 (1954). — Elliott, K. A. C., R. L. Swank and N. Henderson: Effects of anaesthetics and convulsants on acetylcholine content of brain. Amer. J. Physiol. **162**, 469 (1950). — Euler, U. S. v., and B. Pernow: Effects of intraventricular administration of substance P. Nature (Lond.) **174**, 184 (1954). — Neurotropic effects of substance P. Acta physiol. scand. (Stockh.) **36**, 265 (1956). — Gaddum, J. H.: Tryptamine receptors. J. of Physiol. **119**, 363 (1953). — Recent work on 5-hydroxytryptamine and lysergic acid derivatives. Résumés des Rapports, XX^{e} Congrès internat. Physiologie Bruxelles, S. 442, 1956. — Gaitonde, M. K., and D. Richter: The metabolic activity of the proteins of the brain. Proc. Roy. Soc. (Lond.) Ser. B, **145**, 83 (1956). — Herken, H., u. D. Neubert: Der Acetylcholingehalt des Gehirns bei verschiedenen Funktionszuständen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 223 (1953). — Hild, W., u. G. Zetler: Über das Vorkommen der Hypophysenhinterlappenhormone im Zwischenhirn. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 139 (1951). — Kopera, H., u. W. Lazarini: Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. IV. Mitteilung. Die Verteilung der Substanz P im Zentralnervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 214 (1953). — Lembeck, F.: Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. III. Mitteilung. Über das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. Arch exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 197 (1953). — Loewi, O.: On the intraneural state of acetylcholine. Experientia (Basel) **12**, 331 (1956). — Paasonen, M. K., and M. Vogt: The effect of drugs on the amounts of substance P and 5-hydroxytryptamine in mammalian brain. J. of Physiol. **131**, 617 (1956). — Pernow, B.: Studies on substance P. Purification, occurrence and biological actions. Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, Suppl. 105 (1953). — Richter, D., and J. Crossland: Variation of acetylcholine content of the brain with physiological state. Amer. J. Physiol. **159**, 247 (1949). — Richter, D., and R. M. C. Dawson: The ammonia and glutamine content of the brain. J. of Biol. Chem. **176**, 1099 (1948). — Stern, P., u. S. Hukovic: Substanz P und Tetanustoxin. Naturwissenschaften **43**, 538 (1956). — Tobias, J. M., M. A. Lipton and A. A. Lepinat: Effect of anaesthetics and convulsants on brain-acetylcholine content. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **61**, 51 (1946). —

Torda, C.: Ammonium ion content and electrical activity of the brain during the preconvulsive and convulsive phases induced by various convulsants. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 197 (1953). — Vogt, W.: Pharmacologically active lipid-soluble acids of natural occurrence. Nature (Lond.) **179**, 300 (1957). — Waelsch, H.: Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsel des Gehirns. Naturwissenschaften **40**, 404 (1953). — Zetler, G.: Substanz P, ein Polypeptid aus Darm und Gehirn mit depressiven, hyperalgetischen und Morphin-antagonistischen Wirkungen auf das Zentralnervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 513 (1956a). — Wirkungsunterschied zwischen den Polypeptiden Bradykinin und Substanz P am Zentralnervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 148 (1956b). — Zetler, G., u. L. Schlosser: Substanz P im Zentralnervensystem des Rindes. Naturwissenschaften **40**, 559 (1953). — Substanz P im Gehirn des Menschen. Naturwissenschaften **41**, 46 (1954). — Über die Verteilung von Substanz P und Cholinacetylase im Gehirn. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 159 (1955).

Doz. Dr. G. Zetler,
Pharmakologisches Institut der Universität Kiel, Hospitalstr. 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 211—218 (1957)

Physiologisches Institut der Universität Basel
(Vorsteher: Prof. Dr. M. Monnier)

Topische Wirkung des Phenobarbitals auf Cortex, Rhinencephalon, Nucleus caudatus, Thalamus und Substantia reticularis des Kaninchens

Von
H. Gangloff und M. Monnier

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. April 1957)

Obwohl ausgezeichnete Untersuchungen in großer Zahl (Tatum, 1939) Toman and Davis, 1949; Wikler, 1952; Goodman and Gilman, 1956; vorliegen, ist die Diskussion um den zentralen Angriffsmechanismus der Barbiturate nicht abgeschlossen. Seitdem wir die zentrale Wirkung des Phenobarbitals zum erstenmal topisch untersuchten (Gangloff u. Monnier, 1955, 1957), wurden neue Beobachtungen gewonnen, die die vorhandenen Auffassungen in mancherlei Hinsicht ergänzen. Insbesondere ist dem Zusammenhang zwischen Dosierung, Bewußtseinslage, Verhalten des Kreislaufs und der Atmung, spontaner hirnelektrischer Tätigkeit und topisch-pharmakologischer Wirkung größere Beachtung geschenkt worden.

Methodik

Unsere Technik ist wiederholt ausführlich beschrieben worden (Gangloff u. Monnier 1955, 1956, 1957). Wir begnügen uns hier mit einem kurzen Hinweis.

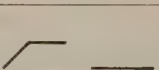
Bei 22 nicht narkotisierten Kaninchen wurde im Cortex, im Ammonshorn, im thalamischen intralaminären System, im lateralen Thalamus und in der mesencephalen Substantia reticularis elektrisch gereizt und abgeleitet. Außerdem erfolgten Ableitungen im Caudatuskopf. Ferner wurden die Tiere mit optischen und akustischen Sinnesreizen getestet. Die elektrische Hirntätigkeit, sowie die Herz- und die Atemfrequenz wurden auf einem Schwarzer 16 Kanal Elektroencephalographen registriert. Die elektrischen Reizungen wurden mit dem Impulsgenerator von O. A. M. Wyss vorgenommen. Das Phenobarbital wurde langsam i.v. verabreicht (5—10 ml in etwa 2 min). Die injizierten Dosen wechselten zwischen 20 und 100 mg/kg. Nach der Injektion wurden die Beobachtungen über 2 Std fortgesetzt[1].

Ergebnisse

Die wesentlichen Ergebnisse sind in Tab. 1 vergleichend zusammengefaßt. Wir unterscheiden die Wirkung von schwachen, mittleren und starken Dosen:

[1] Wir danken Herrn R. Tissot für seine Mithilfe bei der Durchführung der Experimente.

Tabelle 1. *Phenobarbital*

Dosis · mg/kg			20—25	30—50	100
Bewußtseinslage			nicht sicher verändert	Dösigkeit Indifferenz	Schlaf
Attention Reaction (Sinnesreize)			0	(∨)	∨
Arousal Reaction (Elektr. Reiz. Form. Ret.)			(∧)	(∨)	∨
Spontanes EEG			Keine Änderung oder angedeutet slow wawes + spindles. Dauer: 10—30 min	High voltage slow waves, spindles. Dauer: $1^1/_2$—2 Std	Generalisierte high voltage slow waves, spindles. Dauer: über 2 Std
Atemfrequenz			(∨)	(∨)	∨
Pulsfrequenz			0	(∨)	∧
Reizantwort →		C	∨	(∧) ∨	∨
Discharge	TH	Ca	∨	(∧) ∨	∨
		Th	∨	(∧) ∨	∨
	RH	C	∨	∧ ∨	∧ ∨
		Ca	∨	∧ ∨	∧ ∨
		Rh	∨	∧ ∨	∧ ∨
		Th	∨	∧ ∨	∧ ∨
		Re	∨	∧ ∨	∧ ∨
	RE	C	(∨)	∨	∨
		Ca	0	(∨)	(∨)
		Rh	0	(∨)	(∨)
		Th	(∨)	(∨)	∨
Elektr. Reizung →		Re	(∧)	0	∨
Schwelle / After-discharge		C			
		RH			
Elektr. Reizung →		TH			

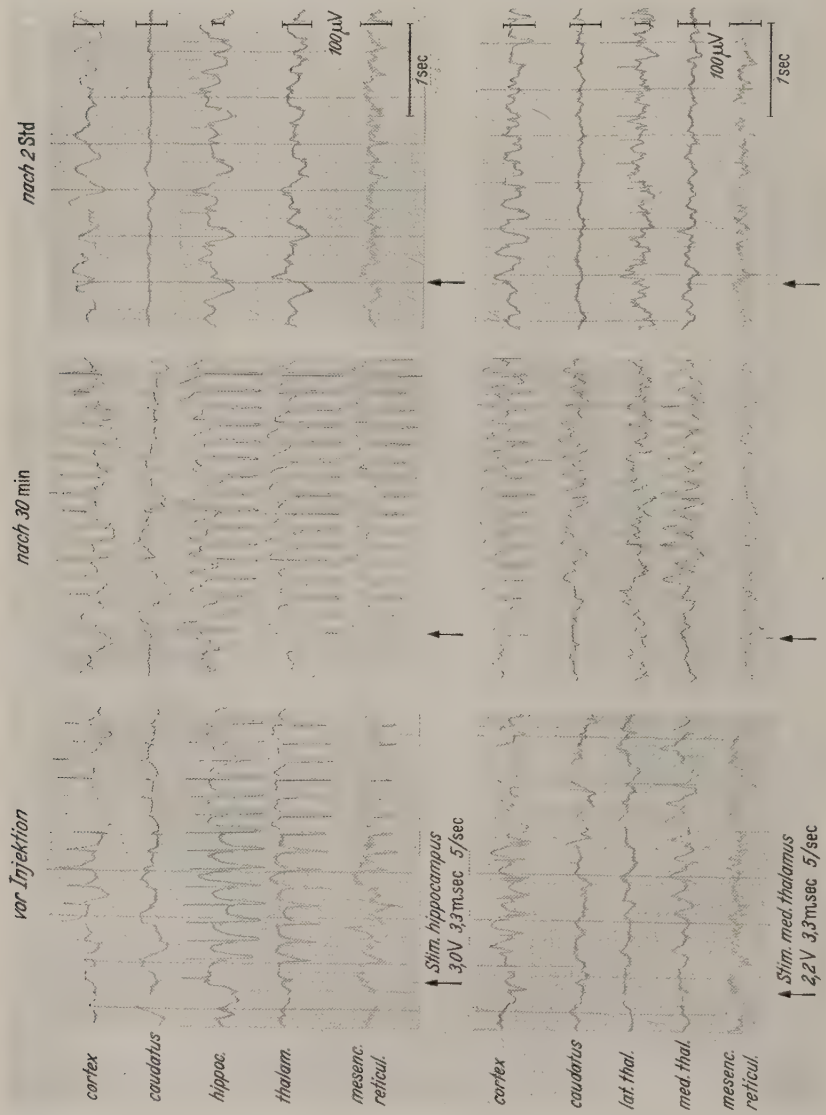
∨ Dämpfung ∧ Steigerung ( ) Angedeutet 0 Keine Änderung

C = Cortex; Ca = N. Caudatus; Th = Thalamus; Re = Formatio reticularis; RH = Rhinencephalon

1. Schwache Dosen (20—25 mg/kg). Die Bewußtseinslage ist nicht sicher verändert. Die Tiere sind wach. Die elektrographische „attention reaction" auf Sinnesreize (Gangloff u. Monnier 1956) ist nicht verändert. Die elektrische arousal reaction auf Reizung der mesencephalen Substantia reticularis ist sogar leicht gesteigert. Das spontane EEG ist nicht signifikant verändert oder es ist eine kurzdauernde, high voltage slow waves Tätigkeit mit spindles cortical angedeutet. Erst nach dem Abklingen dieser Phase setzt gelegentlich eine länger anhaltende, leichte Bradypnoe ein. Die Pulsfrequenz bleibt unverändert. Schon nach 10 min ist die durch Reizung des med. Thalamus induzierte spike and wave Rekrutierung im med. Thalamus, im Nucleus caudatus und im Cortex gedämpft. Eine kräftige Dämpfung des Ammonshorns und seiner Projektionen setzt spätestens nach 1—2 Std ein. Die durch Reizung der mesencephalen Substantia reticularis induzierte Spitzenantwort ist im Cortex und im Thalamus leicht gedämpft, im Mesencephalon selbst dagegen — oft nach 10 min schon — leicht gesteigert. Im Ammonshorn und im Nucleus caudatus sind die induzierten reticulären Spitzen nicht signifikant verändert. Die Schwelle der After-Discharge sinkt im Cortex leicht ab, steigt dagegen im Rhinencephalon (Ammonshorn) und im lat. Thalamus an (Gangloff u. Monnier 1955).

2. Mittlere Dosen (30—50 mg/kg). Die Tiere sind leicht dösig und reagieren gleichgültiger. Elektrographisch sind die attention reaction auf Sinnesreize und die arousal reaction auf mesencephale Reticularisreizung nach 10—30 min — besonders im Cortex — herabgesetzt. Das spontane EEG zeigt im Cortex, im Nucleus caudatus und im Thalamus eine deutliche high voltage slow waves Tätigkeit mit spindles, die nach einer gelegentlichen, kurzen Initialphase mit gesteigerter Spitzen- und sharp waves Tätigkeit einsetzen und etwa $1^1/_2$—2 Std fortdauern. Innerhalb der 1. Std — jedoch im allgemeinen später als die slow waves Tätigkeit — entwickelt sich eine leichte, länger anhaltende Bradypnoe. In der 2. Std kommt es gelegentlich zu einer Bradykardie. Innerhalb der ersten 30 min ist die durch Reizung des intralaminären, thalamischen Systems induzierte spike and wave Rekrutierung im Cortex, im Nucleus caudatus und im med. Thalamus gesteigert. In der 2. Std ist sie gedämpft. Gelegentlich ist die Erregbarkeit des Ammonshorns und seiner Projektionen anfänglich gesteigert. Nach 2 Std jedoch ist sie deutlich gedämpft (Abb. 1). Die Erregbarkeit der Substantia reticularis ist im Mesencephalon nicht sicher verändert, jedoch sind die corticalwärts fortgeleiteten Impulse dieses Systems, vor allem im Nucleus caudatus, im Ammonshorn und im Cortex gedämpft. Die Schwelle der After-Discharge ist im Cortex nicht oder wenig erhöht. Im Rhinencephalon ist sie leicht oder nicht sicher erhöht. Im Thalamus steigt sie deutlich an.

3. Starke Dosen (100 mg/kg). Die Tiere schlafen. Attention und arousal reaction sind cortical und subcortical stark gedämpft oder aufgehoben.



Sofort nach der Injektion setzt im spontanen EEG eine generalisierte, langanhaltende high voltage, slow wave Tätigkeit mit Spindles im Cortex und im Nucleus caudatus ein. Die Atmung ist nach 1—5 min lang dauernd verlangsamt. Sofort oder innerhalb der ersten 30 min setzt

gelegentlich eine Tachykardie ein. Schon nach 10 min beginnt eine kräftige Dämpfung der durch Reizung des thalamischen, intralaminären

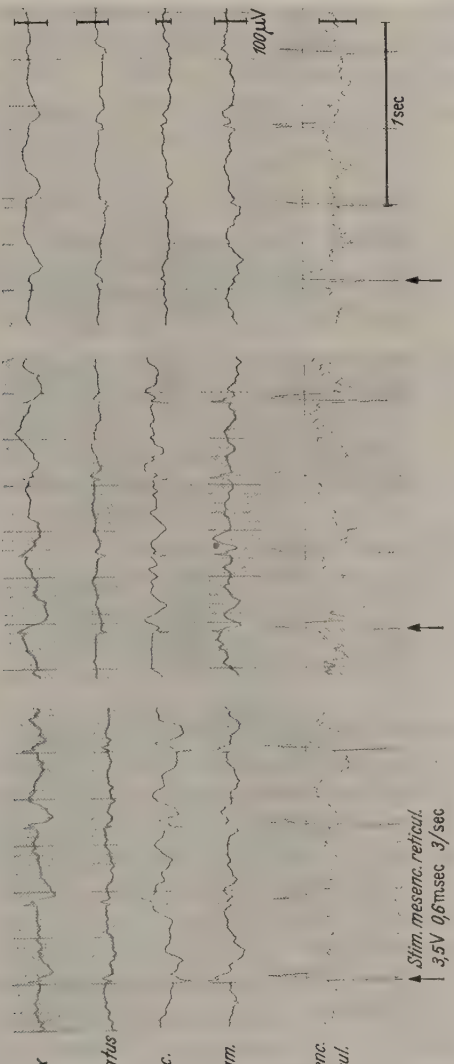


Abb. 1. Wirkung der i.v. Injektion mittlerer Phenobarbitaldosen (30 mg/kg) auf die durch elektrische Reizung der mesencephalen Substantia reticularis, des intralaminären Thalamus und des Ammonshorns (Hippocampus) induzierte Antwort (Discharge). Nach 30 min kommt es zu einer vorübergehenden Steigerung der Ammonshornentladung und der thalamischen, intralaminären spike and wave Rekrutierung. Nur im Cortex und im Nucleus caudatus ist zu dieser Zeit die mesencephal induzierte, reticuläre Spitzenantwort schon gedämpft. Nach 2 Std jedoch dämpft das Phenobarbital sowohl das Rhinencephalon, als auch das thalamische intralaminäre und das aufsteigende, reticuläre Aktivierungssystem. Nur der mesencephale Anteil des reticulären Systems ist nicht signifikant gedämpft

Systems induzierten spike and wave Rekrutierung im med. Thalamus im Nucleus caudatus und im Cortex. Die Wirkung auf das Rhinencephalon ist uneinheitlich. Nicht selten ist die Ammonshorndischarge

gesteigert. Die durch Reizung der mesencephalen Substantia reticularis induzierten Spitzen sind — oft nach 30 min schon — nicht allein im Thalamus, im Nucleus caudatus, im Ammonshorn und im Cortex, sondern auch im Mesencephalon selbst gedämpft. Die Schwelle der After-Discharge ist im Cortex und im Thalamus erhöht, im Rhinencephalon nicht signifikant verändert (Abb. 2).

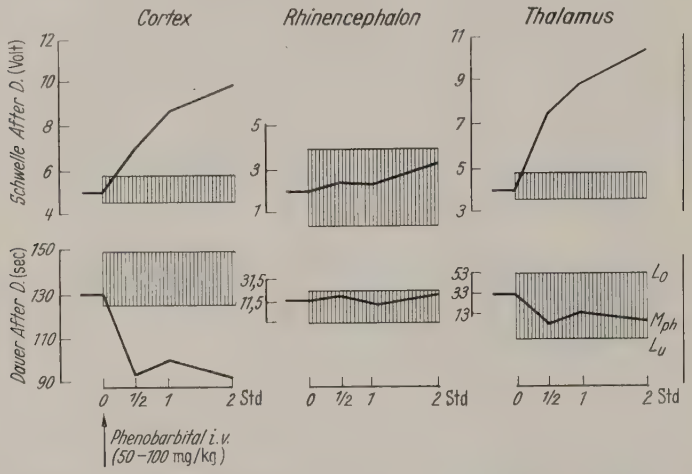


Abb. 2. Wirkung hoher Phenobarbitaldosen (100 mg/kg i.v.) auf Schwelle und Dauer der After-Discharge in Cortex, Rhinencephalon und Diencephalon (lat. Thalamus) beim nicht narkotisierten Kaninchen. L_o—L_u Obere und untere Grenze der Variabilität bei der gleichen Anzahl von Kontrolltieren. M_{ph} Pharmakologischer Mittelwert aus 5 behandelten Tieren

Diskussion

Die Ansicht, Phenobarbital wirke ubiquitär im Zentralnervensystem (Wikler, 1952; Maynert and van Dyke, 1950) ist ungenau. Unsere Befunde zeigen eine deutliche Anhängigkeit der Art und der Topik dieser Wirkung von der verabreichten Dosis (Tab. 1).

Die Dämpfung der corticalen Erregbarkeit, die wir vor allem bei mittleren und starken Dosen finden, ist seit langem bekannt (Keller u. Fulton, 1931; Bremer, 1936; Adrian, 1941). Mit ansteigenden Dosen tritt die hypnotische Wirkung des Mittels in den Vordergrund (Tab. 1). Im spontanen EEG nimmt die slow waves und spindle Tätigkeit zu. Attention und arousal reaction nehmen ab. Zugleich verändert sich die Erregbarkeit des thalamischen, intralaminären Systems und des aufsteigenden, reticulären Aktivierungssystems (Moruzzi u. Magoun, 1949). Bei *schwachen* Dosen (20—25 mg/kg), die keine merkliche Bewußtseinsänderung bewirken, ist die durch Reizung des intralaminären Thalamus induzierte spike and wave Rekrutierung bereits gedämpft. Die Erregbarkeit des reticulären Systems dagegen ist im Mesencephalon nicht herabgesetzt, ja, gelegentlich sogar gesteigert. Bei *mittleren* Dosen

(30—50 mg/kg) sind die Tiere leicht dösig und gleichgültig. Zuerst kommt es zu einem gesteigerten Aufleben der thalamisch induzierten spike and wave Rekrutierung (Abb. 1), später ist das intralaminäre System gedämpft. Nur der thalamo-corticale Abschnitt des reticulären Systems ist deutlich gedämpft. Die Erregbarkeit der mesencephalen Reticularis bleibt unverändert erhalten. Erst *hohe* Dosen (100 mg/kg) lösen Schlaf aus. Sie dämpfen sowohl den intralaminären Thalamus, als auch das reticuläre System im Mesencephalon selbst und im aufsteigenden thalamo-corticalen Abschnitt. Das funktionelle Zusammenspiel beider Systeme ist somit ausgeschaltet. Berücksichtigt man die Tatsache, daß dieses Zusammenspiel im physiologischen Schlaf erhalten bleibt, so mag die schwere Erweckbarkeit des pharmakologischen Schlafs hieraus verständlich werden.

Unsere Befunde zeigen ferner, daß aus dem spontanen Auftreten corticaler „spindles" unter pharmakologischen Bedingungen nicht ohne weiteres auf eine Aktivierung des thalamischen, intralaminären Systems geschlossen werden kann (Lindsley, Bowden u. Magoun, 1949). Die Tatsache, daß die Spindeltätigkeit im Cortex und im Nucleus caudatus trotz der starken Dämpfung des intralaminären Thalamus weitergeht, spricht für eine zumindest partielle Autonomie der Spindelbildung im Cortex (Jasper, 1949) wie auch im Nucleus caudatus. Daß nur schwache Dosen das Rhinencephalon eindeutig und konstant dämpfen, ist auffallend. Möglicherweise kommt es bei stärkeren Dosen zum Fortfall von hemmenden cortico-thalamischen Einflüssen auf das rhinencephale System. Die besonders bei schwächeren Dosen oft zu beobachtende, zeitliche Verschiebung zwischen der slow wave Tätigkeit im spontanen EEG und der erst später oder nach Abklingen dieser Phase auftretenden Depression der Atmung deutet darauf hin, daß die Wirkung des Phenobarbitals auf das Bewußtsein und die Atmung zwei topisch verschiedene Systeme trifft. Die durch hohe Dosen ausgelöste Tachykardie scheint durch ein Absinken des Blutdrucks bedingt zu sein.

Summary

The topic action of various doses of Phenobarbital has been studied in unanesthetized rabbits.

Weak doses (20—25 mg./kg.), inducing no marked behavioural alterations, depress the recruiting activity induced by stimulation of the intralaminary thalamus and enhance the excitability of the reticular formation at the midbrain level. Doses (30—50 mg./kg.) inducing drowsiness and indifference transitorily enhance and later depress the recruiting activity induced by thalamic intralaminary stimulation. Only the thalamo-cortical level of the ascending reticular system is depressed, whereas the midbrain reticular excitability remeins unchanged. Only high doses

inducing sleep (100 mg./kg.) depress both the recruiting intralaminary system of the thalamus and the whole reticular system including its midbrain area, thus blocking the interaction between both systems.

The excitability of the cortex is decreased by higher doses only and may be increased by weak doses. The rhinencephalon is definitely depressed by weak doses only.

Literatur

Adrian, E. D.: J. of Physiol. **100**, 159 (1941). — Bremer, F.: C. r. Soc. Biol. Paris **121**, 861 (1936); **124**, 848 (1937). — Gangloff, H., u. M. Monnier: Helvet. physiol. Acta **13**, C 15 (1955). — Clin. Neurophysiol. **8**, 623 (1956); **9**, 43 (1957). — Pflügers Arch. **261**, 421 (1955). — Helvet. physiol Acta **15**, 83 (1957). — Goodman, L. S., and A. Gilman: Pharmacological bases of therapeutics. New York: The MacMillan Company 1956. — Jasper, H.: Clin. Neurophysiol. **1**, 405 (1949). — Keller, A. D., and J. F. Fulton: Amer. J. Physiol. **97**, 537 (1931). — Lindsley, D. B., J. W. Bowden and H. W. Magoun: Clin. Neurophysiol. **1**, 475 (1949). — Maynert, E. W., and H. B. van Dyke: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 184 (1950). — Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Clin. Neurophysiol. **1**, 455 (1949). — Tatum, A. L.: Physiologic. Rev. **19**, 472 (1939). — Toman, J. E. P., and J. P. Davis: Pharmacol. Rev. **1**, 425 (1949). — Wikler, A.: Federat. Proc. **11**, 647 (1952).

Prof. Dr. M. Monnier, Physiologisches Institut der Universität Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 219—234 (1957)

Aus dem Pharmakologischen und dem Physiologischen Institut
der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.

Aktionspotentiale der Nierennerven* **

Von
ROBERT ENGELHORN

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Mai 1956)

Bei der Freilegung der Niere und ihrer Gefäße fällt die große Zahl der sie versorgenden Nerven auf. HIRT[26] und JOST[27] haben in anatomischen und funktionellen Studien deren Verlauf untersucht. Obwohl zwischen den einzelnen Tierarten starke Unterschiede bestanden, fanden sie regelmäßig, daß diese Fasern nicht nur aus dem Ganglion coeliacum und dem Ganglion mesentericum sup. kamen, sondern auch direkte Verbindungen zwischen dem Bauchsympathicus und der Niere bestanden. Der parasympathische Anteil trat dabei gegenüber dem sympathischen zurück.

BERNE[3], BERNE, HOFFMANN, KAGAN u. LEVY[4], ELLINGER u. HIRT[10,12], HARTMANN, ØRSKOW u. REIN[19], JOST[27], MAUERHOFER[30] und andere erforschten den Einfluß, den die Nierennerven auf die sekretorische Funktion oder die Durchblutung der Niere ausübten. Sie unterschieden sich dabei nur durch die Fragestellung oder die Methode zur Messung des Effektes und vergleichen im übrigen die Leistung der vollständig denervierten mit denen der intakten Niere.

Eine andere Möglichkeit, einen Einblick in den Angriffspunkt der Nerven zu erhalten, bestand in der elektrischen Reizung (BERNARD[2], BRADFORD[6], BURTON-OPITZ u. LUCAS[7], COHNHEIM u. ROY[11]). Die von CELANDER[9] veröffentlichte Arbeit über das Ausmaß der sympathico-adrenalen Kontrolle der Durchblutung verschiedener Organe verglich unter anderem auch an der Niere die Wirkung der Nervenreizung mit der von Adrenalin und Nor-Adrenalin. Trotz der Vielzahl von Untersuchungen ist das Gesamtbild voller Widersprüche.

Eine Tatsache scheint jedoch gesichert zu sein: Sowohl die Durchblutung als auch die ausgeschiedene Harnmenge sind nach der Denervation vermehrt. Die Beweise dafür erbrachten CARREL u. GURTHRIE[8], ELLINGER[11], sowie SCHNEIDER u. WILDBOLZ[32]. Das würde bedeuten, daß die Nierennerven einen hemmenden oder zumindest regulierenden Einfluß auf die Nierenfunktion ausübten.

Es war daher überraschend, in der Literatur keine Mitteilung über das elektrische Verhalten der Nierennerven finden zu können. Auch die Zahl der Untersuchungen, die sich mit Aktionspotentialen anderer

* Die Untersuchungen wurden mit Hilfe elektrophysiologischer Apparaturen durchgeführt, die von der Deutschen Forschungsgemeinsdaft dem Physiologischen Institut der Universität (Prof. Dr. P. HOFFMANN) zur Verfügung gestellt waren.

** Herrn Professor Dr. S. JANSSEN zum 65. Geburtstag gewidmet.

sympathischer Fasern des Bauchraumes befassen, ist gering. Adrian, Bronk u. Phillips[1], Gernandt, Liljestrand u. Zotterman[16], sowie Gernandt u. Zotterman[17] leiteten Aktionspotentiale vom N. splanchnicus der Katze ab. Sie wiesen auf den Zusammenhang zwischen dem elektrischen Verhalten dieses Nerven und dem des Kreislaufs hin. Insbesondere betonten sie deren Abhängigkeit von den Regulationsmechanismen des Carotissimus und des Aortenbogens.

Durch die Registrierung der Impulse der Chemo- und der Pressoreceptoren (v. Euler, Liljestrand u. Zotterman[13], Landgren[28], Bronk u. Stella[5]) sind wir über das Verhalten dieser Nerven gut unterrichtet. Nach ihrer Ausschaltung ändern sich auch die Entladungen im Bauchsympathicus[16].

In der vorliegenden Arbeit wurde das elektrische Verhalten intakter Nierennerven bei Änderungen des Blutdruckes untersucht.

Methodik

Den Ergebnissen liegen 93 registrierte Versuche an 27 männlichen Katzen zugrunde. Sie wurden in der Zeit von Mai 1954 bis April 1955 durchgeführt. Die Tiere wurden entweder mit Chloralose (80 mg/Kg i. v.), mit Chloralose-Urethan (Chloralose 60 mg/Kg, Urethan 100 mg/Kg i. v.) oder Numal (50 mg/Kg i. v.) narkotisiert.

Die Ableitung der Aktionspotentiale erfolgte von den Nerven der linken Niere, da hier die räumlichen Verhältnisse besser als auf der rechten Seite sind. Bei den ersten Versuchen wurde der Bauch in der Mittellinie eröffnet, die Eingeweide beiseite gedrängt und in angewärmte, mit Kochsalzlösung getränkte Tücher eingehüllt. Die Präparation der Nerven war durch Fett, zahlreiche Lymphgefäße und eine zum Teil starke Vascularisation erschwert. Außerdem wich die Lage der Nerven häufig von der von Hirt [26] angegebenen Topographie ab.

Die Durchtrennung des Peritoneums und die Zerrung der Eingeweide schien ein so schwerer Eingriff zu sein, daß in den späteren Versuchen die Niere vom Rücken aus extraperitoneal freigelegt wurde. Die Ableitung der Nervenimpulse geschah dann in Seitenlage. Die Versuchsergebnisse verbesserten sich durch diese Operationsmethode wesentlich.

Der Nerv wurde vorsichtig aus dem ihn umgebenden Gewebe herausgelöst und von seiner Nervenscheide befreit. Nach Möglichkeit schonte ich das begleitende Gefäß und drängte es beiseite. Danach wurde er über eine U-förmig gebogene Glasschleife gelegt, die an einem Halter befestigt war. Zwischen den beiden Branchen dieser Schlinge wurden die zur Ableitung verwendeten Wollfadenelektroden auf den Nerv aufgelegt. Dadurch war er gegen die Bewegungen der Umgebung geschützt und es konnte ein konstanter Elektrodenabstand eingehalten werden.

Die Verstärkung der Potentiale erfolgte über einen Vorverstärker, von wo sie zu einem Kathodenstrahloscillographen geleitet wurden (beide waren von der Fa. J. F. Tönnies, Freiburg i. Br. konstruiert), dessen Strahl ein Phillips-Elektronenschalter spaltete. Dadurch konnten gleichzeitig die Nervenpotentiale und das Elektrokardiogramm registriert werden.

Nach Abschluß der Vorbereitungen wurden die Tiere durch Decken, Wärmeflaschen oder eine Heizsonne gegen Abkühlung geschützt. Den arteriellen Blutdruck registrierte ich aus der A. femoralis über ein Membranmanometer auf ein Rußkymographion. Die Abschnitte, in denen die Nervenimpulse mit der Filmkamera

aufgenommen wurden, markierte ich auf der Rußkurve. Dadurch war später die Koordination der beiden Kurven möglich.

Die untersuchten Substanzen waren in körperwarmer Kochsalzlösung gelöst und wurden entweder in die V. jugularis oder die V. femoralis gespritzt. Die Injektionsdauer betrug durchschnittlich 6 sec. Zwischen den einzelnen Injektionen lag eine Pause von mindestens 30 min.

Die Angabe bestimmter Zeiten bei der Reaktion auf verschiedene Stoffe ist nicht möglich, da sie von Tier zu Tier variierten. Die gleichzeitige Registrierung des Blutdruckes und der Aktionspotentiale läßt aber den genauen Ablauf der Ereignisse erkennen. Sie wurden nach Beendigung des Versuches auf die gezeigten Schemata zeitlich übertragen.

Alle Katzen atmeten spontan. Künstliche Atmung mit der Starling-Pumpe wurde nur nach einem Teil der Asphyxie-Versuche verwendet.

Ergebnisse

Die Art der Impuls-Entladungen der abgeleiteten Nierennerven geht aus den angeführten Kurven hervor. Bei Beginn jedes Experimentes an Katzen mit normalem Blutdruck und intaktem Kreislauf liefen sie herzsynchron. Erst im Laufe längerer Untersuchungen schlossen sich die Lücken zwischen den einzelnen Salven immer mehr und nahmen zuletzt die Form von Dauerentladungen an. Den von Gernandt, Liljestrand u. Zotterman[16] beschriebenen Typ der atemsynchronen Impulse konnte ich nur bei zwei Katzen beobachten.

Ein Unterschied bestand ferner zwischen den einzelnen Narkosemitteln. Bei der Numalnarkose waren die Salven schärfer voneinander getrennt als bei der Chloralose- oder der Chloralose-Urethan-Narkose, wo sie einem dem Herzschlag synchron laufenden An- und Abschwellen glichen.

Nachdem damit die Art der Entladungen erkannt war, mußte die Richtung der Erregungsleitung festgestellt werden. Dazu wurde der N. renalis oder eine der anderen Fasern des Nervengeflechtes über eine Strecke von 2—3 cm frei präpariert, in der Mitte quer durchschnitten und die beiden Enden an Fäden, die an einem Glasstab gefestigt waren, fixiert. An beiden Nervenstümpfen wurden jetzt Elektroden angelegt. Die beschriebenen Potentiale konnten nur vom zentralen Stumpf abgeleitet werden, der periphere Teil blieb stumm. Er konnte weder durch chemische noch durch physikalische Reizung der Nierenoberfläche, des Nierenbeckens oder des Urethers zu zentripctalen Impulsen veranlaßt werden. Der sensible, zentralwärts laufende Faseranteil, der möglicherweise eine Rolle bei der reflektorischen Anurie als Folge von Nierenkoliken spielt, konnte demnach auf diesem Wege nicht erfaßt werden.

Um vielleicht doch noch vorhandene, mir aber nicht erkennbare Reflexbögen zu erhalten, wurden alle hier angeführten Ergebnisse an intakten Nerven abgeleitet. Sie wurden in getrennten Experimenten an peripher durchschnittenen Fasern kontrolliert und führten in beiden Fällen zum gleichen Ergebnis.

a) Asphyxie

Um eine Blutdruckveränderung ohne Zufuhr eines Pharmacons zu erreichen, schien die Asphyxie, auf die ein Anstieg des arteriellen Drucks folgte, besonders geeignet. Sie wurde durch Abklemmen einer

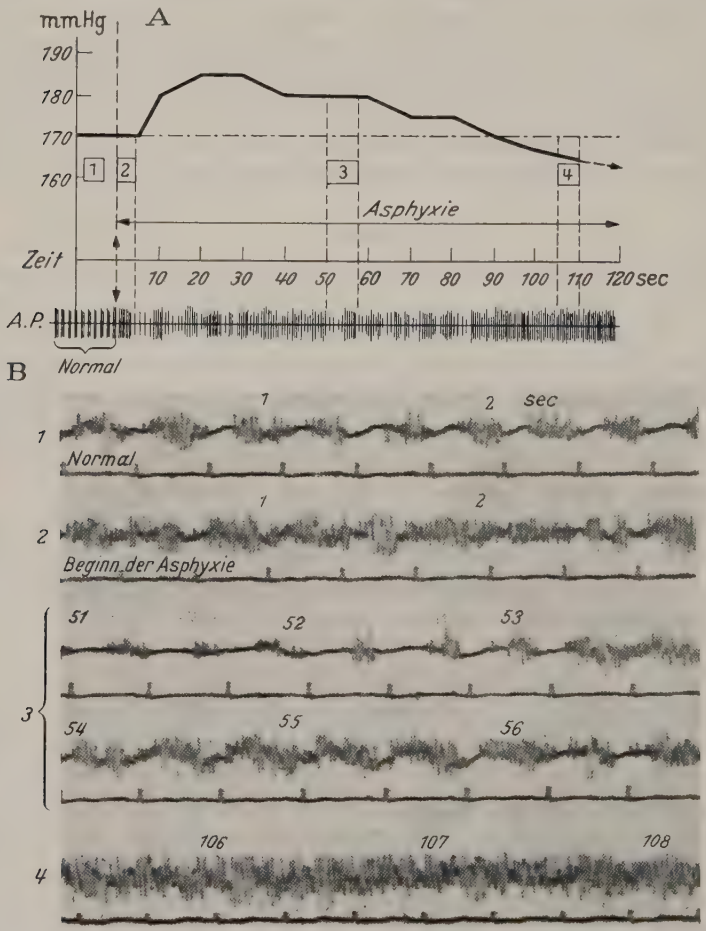


Abb. 1. Versuch vom 25. 1. 55. Katze, 2250 g, Chloralose-Urethan-Narkose. *A* Blutdruck, darunter Zeit und eine schematische Darstellung, um den unmittelbaren Zusammenhang der elektrischen Aktion in Nierennerven mit der Blutdruck-Kurve zu erkennen. Unter *B* Ausschnitte aus den Originalkurven der Aktionspotentiale, die in ihren Zahlen den in der oberen Blutdruckkurve angezeigten Perioden entsprechen. Diese Kurven zeigen oben die Zeit, darunter die Spannungskurve, unten das EKG, um die Beziehungen der Herzaktion zu den Strömen der Nierennerven zu erkennen. Wirkung der Asphyxie

in die Trachea des Versuchstieres eingebundenen kurzen Kanüle erzeugt. Abb. 1 zeigt das Verhalten der Nervenimpulse und das des Blutdruckes.

Wenige Sekunden nach Verschluß der Trachea traten außer den herzsynchronen Potentialen größere Gruppen auf, die mit zunehmender Asphyxie immer länger wurden und schließlich zu ungeordneten Dauerentladungen verschmolzen. Von da an sank der anfänglich gesteigerte Blutdruck langsam ab. Wurde, was in der Abbildung nicht mehr gezeigt ist, mit der Starling-Pumpe künstlich beatmet, so verringerte sich die Zahl der Impulse wieder. Sie kehrten aber erst nach $^1/_2$—1 min wieder schrittweise zur Norm zurück. Wurde dagegen die Asphyxie weiter fortgesetzt, so hielten die Dauerentladungen noch etwa 2 min an und hörten dann bei weiter sinkendem Druck auf. In Versuchen, bei denen gleichzeitig die Thoraxbewegungen registriert wurden, konnte festgestellt werden, daß die Potentiale etwa zu dem Zeitpunkt verschwanden, wenn die Gegenbewegungen gegen den Verschluß der Trachea aufhörten. Dann konnte auch die künstliche Beatmung den Tod des Tieres nicht mehr verhindern.

b) Ausschaltung des Parasympathicus

Die beschriebenen Aktionspotentiale entsprachen den von anderen Autoren ([1,16] u. a.) an sympathischen Nerven gemachten Beobachtungen. Nach Hirt[26] ziehen aber auch Fasern aus dem N. vagus zur Niere. Ich untersuchte, welchen Einfluß die Ausschaltung dieses Nerven auf die sympathischen Impulse hat.

Die Durchtrennung erfolgte entweder am Halse oder unterhalb des Durchtritts der beiden Äste durch das Diaphragma. Bei normalem Blutdruck veränderten sich die Impulsentladungen danach nicht. Sie liefen weiterhin synchron dem Herzschlag mit gleicher Amplitude. Die Pulsationen im Bauchraum wurden stärker und erschwerten damit die Registrierung. Bei peripherer Ausschaltung des Parasympathicus durch Atropin (1 mg/kg) ändert sich ebenfalls nichts.

c) Decerebration

Nachdem der Einfluß des Parasympathicus geklärt war, wurden andere Katzen decerebriert. Nach der Operation war der Blutdruck meist auf ein niedrigeres Niveau abgesunken und es kam zu ausgeprägten vasomotorischen Schwankungen. Sie traten auch dann auf, wenn die Tiere nach dem Eingriff 1 Std in Ruhe gelassen wurden.

d) Carotisabklemmung

Die Abklemmung der Carotiden führte durch Entlastung des Carotissinus, wie Abb. 2 zeigt, zu einem Anstieg des Blutdruckes und zu einer Frequenzerhöhung der Nervenimpulse.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren ([1,16] u. a.) überein, die den Zusammenhang zwischen dem Carotissinus (N. caroticus, der pressoreceptorischen Zone des Aortenbogens (N. depressor) und der elektrischen Aktion des N. splanchnicus erkannten.

e) Entblutung

In den vorliegenden Versuchen wurde aus der rechten A. femoralis oder der A. carotis entblutet. Nach Beginn der Entblutung setzte eine zunehmende Aktivität der Nerven ein, die etwa 5 min anhielt und die Form

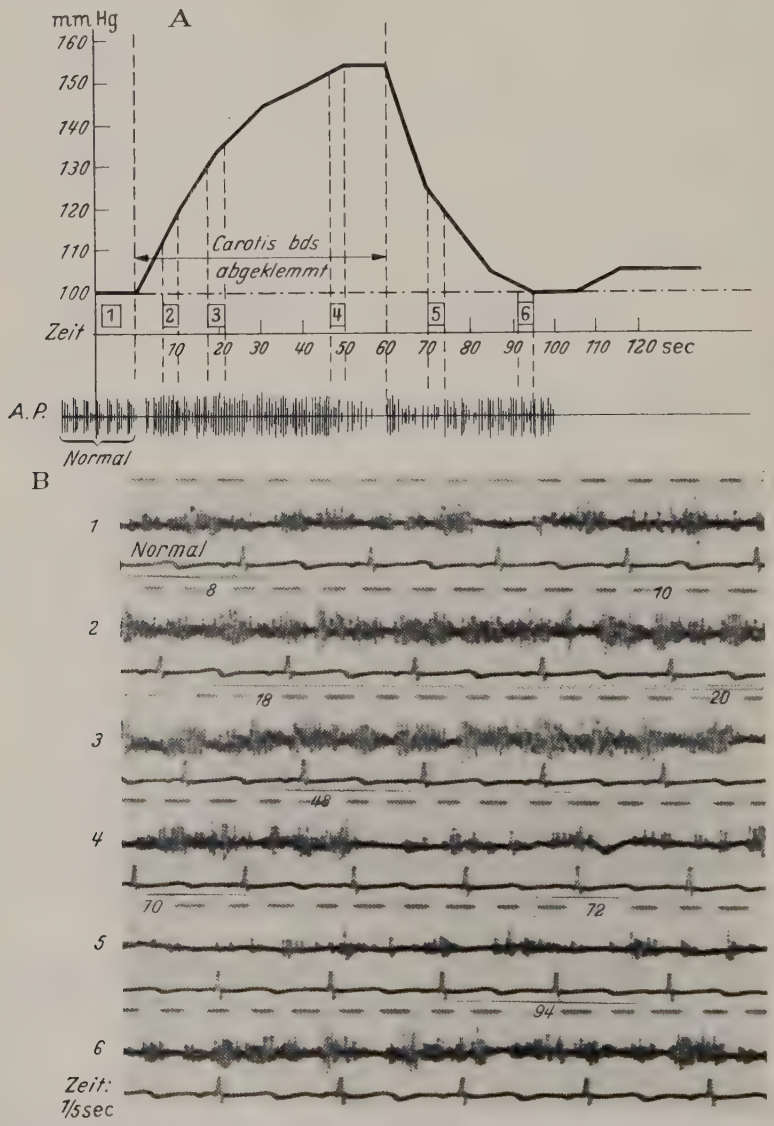


Abb. 2. Versuch am 25. 11. 54. Katze, 2500 g, Chloralose-Narkose. Anordnung der Kurven wie in Abb. 1. Wirkung der Carotis-Abklemmung

von Dauerentladungen annahm. Danach verkleinerten sich die Impuls-Amplituden mehr und mehr, bis sie nach 10—12 min langsam erloschen. Zu diesem Zeitpunkt war der Blutdruck schon fast zur Nullinie abgesunken und das EKG war pathologisch verändert. Es überdauerte jedoch das Ende der Nervenpotentiale oft um weitere 10—12 min.

f) Blutdrucksteigernde Stoffe

Adrenalin. Adrian, Bronk u. Phillips[1] beobachteten nach der i.v. Injektion von 0,5—1 mg Adrenalin am N. splanchnicus der Katze eine Pause der Entladungen, die 5—10 min anhielt, wonach die Potentiale schrittweise wieder zur Norm zurückkehrten. Diese Pause trat in den hier beschriebenen Versuchen schon bei weit geringeren Mengen, nämlich 2—5 γ/kg auf und wurde mit steigender Dosis länger. Vergleicht man die Blutdruckkurve mit der der Aktionspotentiale, so geht der normale Rhythmus nach der Injektion zunächst unverändert weiter (5—10 sec), bis er plötzlich aufhört. Zu diesem Zeitpunkt steigt der Blutdruck bereits an. Auf dem Höhepunkt der Adrenalinwirkung setzen die Entladungen langsam wieder ein. Sie erreichen ihre ursprüngliche Form aber erst dann wieder, wenn die auf die Steigerung folgende Senkung überwunden ist und der Druck den Ausgangswert wieder erreicht hat. Vom Augenblick des Wiederauftretens der Impulse bis zur völligen Stabilisierung sind die Entladungen unrhythmisch und teilweise in größere Gruppen zusammengefaßt.

Nor-Adrenalin. Bei gleicher Dosierung wie in den vorhergegangenen Versuchen entspricht die blutdrucksteigernde Wirkung des Nor-Adrenalins etwa der des Adrenalins. Dementsprechend verhalten sich die Aktionsströme der Nierennerven ähnlich. Nach einer Latenzzeit, in der der Druck bereits zunimmt, verschwinden die Impulse und treten erst am Ende der Steigerung wieder auf. Die Blutdruckkurve kehrt aber, ohne unter den Ausgangswert abzusinken, zu diesem zurück und die Entladungen normalisieren sich schneller als bei Adrenalin. In Abb. 3 wurden zwei Kurven übereinander gezeichnet, die den Unterschied deutlich zeigen.

Die bisher gegebenen Adrenalin- bzw. Nor-Adrenalin-Mengen bewirkten immer eine Steigerung des arteriellen Druckes. Es ist jedoch bekannt, daß sehr kleine Mengen ihn senken können. Während 0,25 γ/kg Nor-Adrenalin noch zu einem leichten Druckanstieg bei unveränderter Impuls-Frequenz führte, fiel er nach der Gabe der gleichen Menge Adrenalin, begleitet von vermehrten Entladungen, ab. Die Dauer der Blutdruckänderung war bei beiden Stoffen etwa gleich.

Vasopressin (Tonephin W.Z.). Die Reaktion, die auf die i.v. Injektion von 1 VE/kg Vasopressin folgte, geht aus Abb. 4 hervor. Zusammen mit dem Anstieg des arteriellen Druckes (aber ebenfalls nach einer Latenzperiode) kam es zu einer starken Verminderung oder zum

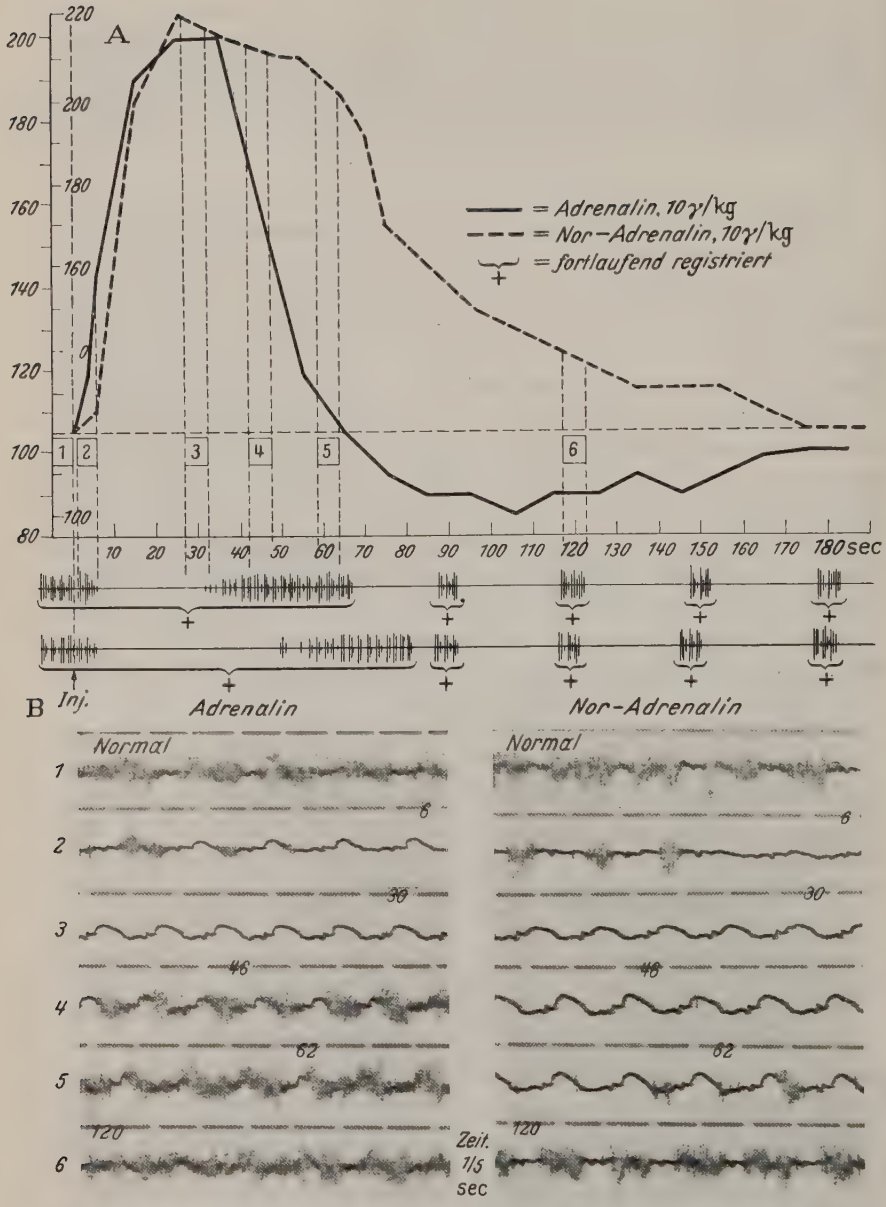


Abb. 3. Versuch am 20. 10. 54. Katze, 3200 g, Numal-Narkose. Anordnung der Kurven wie in Abb. 1. Die EKG-Kurven wurden weggelassen. Wirkung der i.v. Injektion von Adrenalin und Nor-Adrenalin. Die Wirkungen sind für Adrenalin auf der oberen für Nor-Adrenalin auf der unteren schematischen Darstellung gegeben. Während der Adrenalinwirkung sind in den Originalkurven herzsynchrone, langsame Schwankungen sichtbar, die vermutlich durch Übertragung des EKG erfolgten, jedenfalls an sich keine Bedeutung besitzen. Es kommt nur auf die schnellen Oscillationen (spikes) an

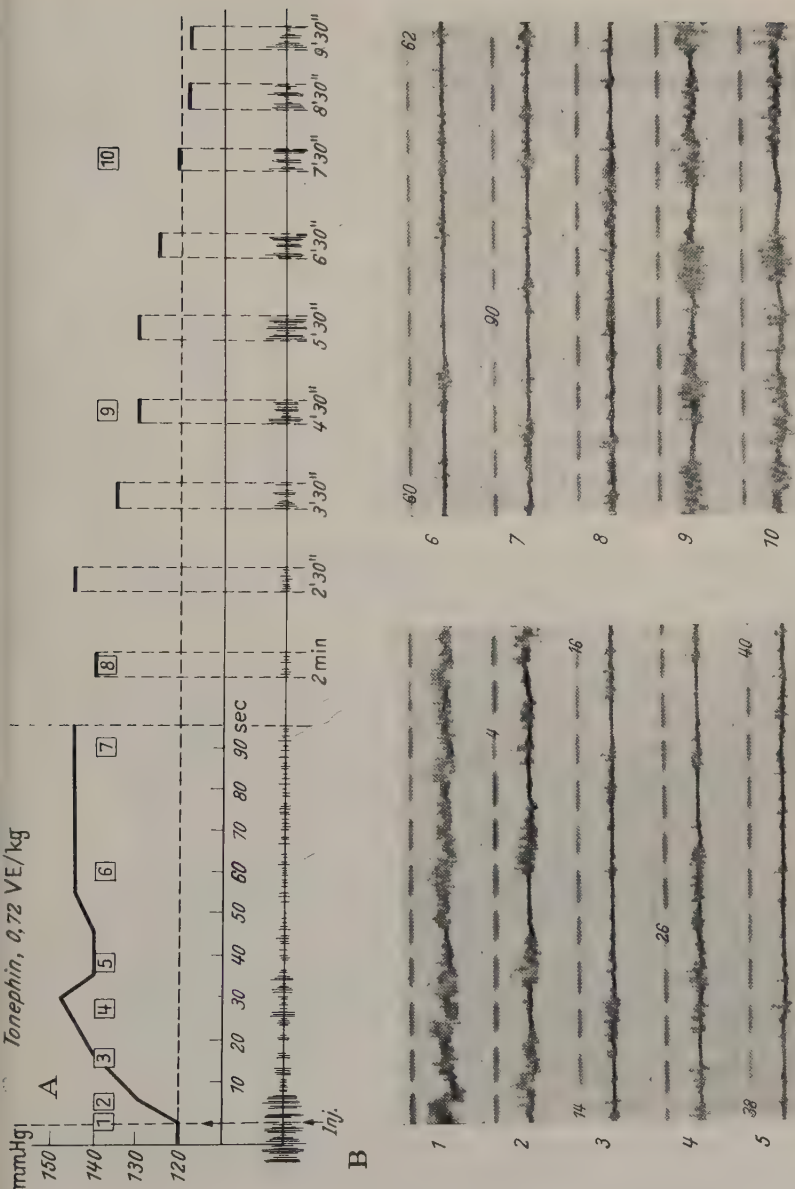


Abb. 4.
Versuch am 18. 2. 55. Katze, 2750 g, Chloralose-Urethan-Narkose. Anordnung der Kurven wie in Abb. 1, ohne EKG. Wirkung von Vasopressin

Aufhören der Entladungen über einen Zeitraum, der viel länger als die „Adrenalin-Pause" war. Selbst dann, wenn er nach der anfänglichen Steigerung etwas unter die Ausgangshöhe absank, blieb die Verminderung der Potentiale weiter bestehen.

Aus der zusammenfassenden Arbeit von Pickford[31] geht hervor, daß zur Erzeugung eines antidiuretischen Effektes wesentlich kleinere Mengen von Hypophysen-Hinterlappenextrakten gegeben werden. Deshalb untersuchte ich die Wirkung von 0,1 und 0,05 VE/kg Vasopressin. Bei dieser Dosierung war der Blutdruckeffekt nur noch unwesentlich. Die Verringerung der Zahl der Aktionspotentiale war auch jetzt noch über mehrere Minuten zu beobachten.

g) Blutdrucksenkende Stoffe

Acetylcholin. Auf die i.v. Zufuhr von 10 γ/kg Acetylcholin sank der arterielle Druck schnell ab. Nach einer Latenzzeit von etwa 5 sec, in der der Abfall bereits im Gange war, kam es an den Nerven zu einer Erhöung der Impulsfrequenz, die über den tiefsten Punkt der Senkung hinaus anhielt. Danach kehrte sie wieder schrittweise zur Norm zurück. Die vorübergehende Verlangsamung des Herzschlages war von kürzerer Dauer als die Reaktion der Nervenpotentiale (Abb. 5).

Histamin. Die plötzliche Erweiterung der Capillaren und die Verteilung des Blutes in ein wesentlich vergrößertes Strombett hatte eine Gegenregulation von seiten des Vasomotorenzentrums zur Folge. Den raschen Druckabfall begleiteten Dauerentladungen, deren Frequenz und Amplitude schnell zunahm und die größer waren als bei Acetylcholin. Auch hier dauerte die Reaktion über den Tiefpunkt der Senkung hinaus an. Die Rückkehr zur ursprünglichen Form der Nervenimpulse erfolgte jedoch später als bei Acetylcholin.

h) Adrenalin-Acetylcholin-Antagonismus

Wie schon beschrieben, folgte auf die Injektion von Adrenalin (über 2 γ/kg) eine Blutdrucksteigerung, die von einer Pause der Impuls-Entladungen begleitet war. Bei Acetylcholin kam es dagegen zu einer Senkung und zu einer Vermehrung der Potentiale. In beiden Fällen trat der nervöse Effekt nach einer Latenz von 5—10 sec ein. Es interessierte mich nun ob Acetylcholin in der Lage sei, die „Adrenalin-Pause" zu durchbrechen.

Der Katze wurden zunächst 10 γ/kg Adrenalin gespritzt und die Dauer der Pause festgelegt. Im zweiten Teil des Versuches wurden etwa in der Mitte der „Adrenalin-Pause" 10 γ/kg Acetylcholin gegeben. 2 bis 3 sec nach der Zufuhr des Acetylcholins traten die ersten Salven wieder auf, die ihr Maximum nach etwa 15 sec erreichten. Nach dem vermutlichen Abbau des Acetylcholins trat dann nochmals der Rest der Adrenalinwirkung in Form einer kurzen Pause in Erscheinung, nach der sich die Nervenpotentiale wieder normalisierten.

i) Der Einfluß eines Sympathicolyticums

Regitin [2-(N-p-tolyl-N-m-hydroxyphenylaminomethyl-2-imidazolin, WZ)]. Da die sympathicolytische Wirkung dieser Substanz nach Injektion von Adrenalin und Nor-Adrenalin verschieden war, soll deren Effekt getrennt besprochen werden.

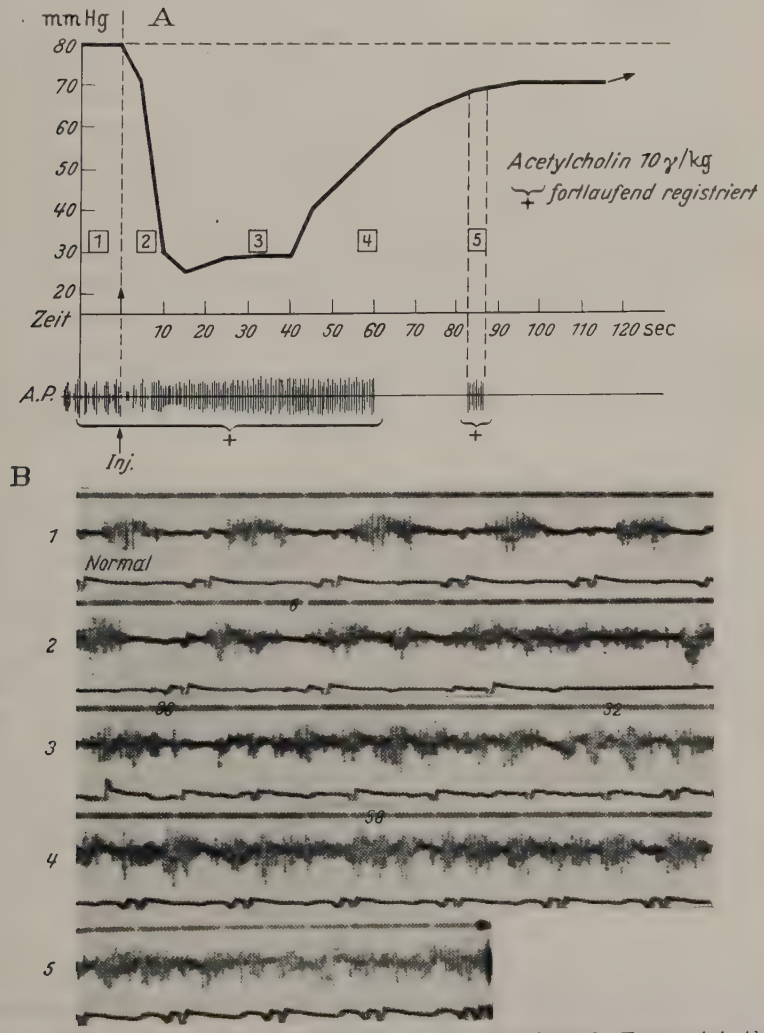


Abb. 5. Versuch am 17. 10. 54. Katze, 2600 g, Numal-Narkose. Anordnung der Kurven wie in Abb. 1. Wirkung der Injektion von Acetylcholin

Zunächst mußten die Folgen der Regitin-Zufuhr allein untersucht werden. Nach Injektion von 500 γ/kg sank der Blutdruck stark ab. Er stellte sich erst im Laufe mehrerer Minuten auf ein niedrigeres Niveau

ein, auf dem er stabil blieb. Die Frequenz der Nervenimpulse stieg während der Senkung stark an und entsprach auch nach Erreichen des neuen Niveaus nicht mehr der ursprünglichen Form. Die vorher scharf voneinander getrennten Salven waren in ungeordnete Dauerentladungen übergegangen. Erst 10—15 min nach der Injektion zeichneten sich die ersten Salven wieder ab.

Regitin-Adrenalin. Das Verhalten des Blutdruckes nach Adrenalin ist aus Abb. 3 bekannt. Wurden danach 500 γ/kg Regitin gespritzt, so war der Druckanstieg nach erneuter Gabe von Adrenalin wesentlich geringer, die anschließende Senkung jedoch stärker. Entsprechend dem Druckablauf verhielten sich die Aktionspotentiale. Die „Adrenalin-Pause" schrumpfte zusammen und es traten im Laufe der anschließenden langdauernden Senkung zeitweise Mehrentladungen auf.

Regitin-Nor-Adrenalin. Bei gleicher Dosierung wie im vorhergegangenen Versuch wurde die Nor-Adreanlin-Wirkung durch Regitin weniger beeinflußt. Der Blutdruck stieg fast gleich hoch an und die Pause im Elektroneurogramm verkürzte sich weniger. Zu einer nachfolgenden Senkung, wie nach Adrenalin, kam es nicht. Die Form der Entladungen wurde wieder früher normal. Eine Vermehrung der Impulse wurde nicht beobachtet und war auch nicht zu erwarten.

k) weitere Befunde

Curare (d-Tubocurarinchlorid „Asta"). Durch den bekannten, klassischen Versuch bewies Bernard[2] den peripheren Angriffspunkt des Curare am Skeletmuskel. Es mußte demnach möglich sein, am curarisierten Tier normale Aktionspotentiale abzuleiten. In meinen Versuchen verwendete ich d-Tubocurarinchlorid und registrierte gleichzeitig die Bewegungen des Thorax, den Blutdruck und die Nervenimpulse. Selbst dann, wenn die Dosierung des Curare so weit gesteigert wurde, daß eine deutliche Anlähmung der Atemmuskulatur zu sehen war, verliefen die Nervenpotentiale wie vor der Curarisierung.

Versuche an Hunden. In zwei Versuchen an Hunden konnte ich ebenfalls herzschlagsynchrone Impulsgruppen an den Nierennerven ableiten, die Lebensdauer der Fasern war jedoch für ausgedehntere Untersuchungen zu kurz.

Besprechung der Ergebnisse

Von den zur Niere ziehenden Nervenfasern wurden Aktionsströme abgeleitet. Sie bestanden aus kurzdauernden Potentialschwankungen von 80—100 μV und waren bei Katzen mit normalem Blutdruck in Salven zusammengefaßt, die entweder gleichzeitig mit der Herzkontraktion oder in der Pause zwischen zwei Kontraktionen auftraten. Sie liefen, wie sich bei Untersuchungen an durchschnittenen Nerven herausstellte, vom Zentrum zur Niere. Die Ausschaltung des Vagus durch

Vagotomie oder Atropinisierung hatte keinen Einfluß auf die Art der Entladungen. Bei Eingriffen, die zu Blutdruckveränderungen führten, verhielten sie sich wie die schon früher von anderen Autoren abgeleiteten Splanchnicuspotentiale. Ihr Ursprungsort ist vermutlich das postganglionäre Neuron des Sympathicus. Dieses wurde vom präganglionären angestoßen, das wiederum mit Zentren in der Medulla oblongata oder noch weiter rostral, im Hirnstamm gelegenen Zentralen in Verbindung steht.

Der Einfluß der verwendeten Narkotica ging aus der Form der Entladungen hervor. Die Salven waren in der Numal-Narkose schärfer voneinander abgesetzt als bei Chloralose oder Chloralose-Urethan, wo sie ein An- und Abschwellen zeigten. Die Eigenschaft der Chloralose, Reflexe zu steigern, ist ebenso bekannt wie die hemmende Wirkung der Barbiturate. Ob die unter Chloralose erhöhte Bereitschaft für vegetative Reflexe mit der Abgrenzung der Salven zusammenhängt, kann auf Grund des vorliegenden Materials nicht entschieden werden.

Die Decerebration engte den Kreis der für die Entstehung der Impulse in Frage kommenden Teile des Nervensystems auf das Stammhirn und die Medulla oblongata mit den darin liegenden vegetativen Zentren ein, die teilweise der Steuerung durch die Regulationsmechanismen des Carotissinus und der Aorta unterliegen. Die Abhängigkeit des Kreislaufs von den genannten Mechanismen wurde vielfach untersucht ([21,21] u. a.). Das elektrische Verhalten der chemo- und der pressoreceptorischen Nerven klärten vor allem schwedische und amerikanische Forscher auf ([13,14,15,18]). Es gelang ihnen, beide Systeme getrennt darzustellen. Gernandt, Liljestrand u. Zotterman[16] faßten ihre Wirkungsweise folgendermaßen zusammen: „Die allgemein angenommene Erklärung besagt, daß die durch Reizung der Pressoreceptoren ausgelösten Impulse eine Hemmung der für die Vasoconstriction, die Pulsbeschleunigung und die Adrenalinsekretion verantwortlichen Zentren bewirkt. Die Reizung der Chemoreceptoren ruft dagegen eine weitere, gesteigerte Aktivität dieser Zentren hervor."

Unter diesen Gesichtspunkten lassen sich zum Teil auch die von mir erhobenen Befunde verstehen. Eine Steigerung des arteriellen Druckes hatte eine Entladungspause zur Folge, während auf eine Senkung eine Frequenzerhöhung einsetzte. Durch Denervation des Carotissinus und Durchtrennung des N. depressor konnten diese Reaktionen weitgehend verhindert werden ([16] und eigene Beob.). Im allgemeinen wurden nur brüske Änderungen des Blutdruckes von deutlichen Nervenreaktionen begleitet, langsam verlaufende hatten dagegen keinen oder nur einen undeutlichen Effekt.

Eine Erklärung der Vorgänge bei der Asphyxie und der Carotisabklemmung erübrigt sich. Sie entsprachen den von anderen Autoren [16] am

N. splanchnicus gemachten Beobachtungen, deren Ursachen von ihnen ausführlich behandelt wurden. Bei der Asphyxie fiel als Besonderheit auf, daß etwa mit dem Ende der krampfhaften Atembewegungen auch die Nervenpotentiale kleiner wurden.

Beim Anstieg des Blutdruckes durch Gabe von Adrenalin oder Nor-Adrenalin kam es zunächst zu einer Hemmung der Entladungen, die wahrscheinlich durch eine Reizung der Pressoreceptoren zustande kam. Das Absinken des Druckes und die Rückkehr zur Ausgangshöhe verlief bei Adrenalin meist mit einer „negativen" Periode, in der die Potentiale vermehrt waren, während sich bei Nor-Adrenalin die Impulse bald wieder normalisierten und der Druck gleichmäßig zum Ausgangsniveau absank. Der Unterschied zwischen beiden Stoffen wurde bei der Injektion kleiner Mengen noch deutlicher. Nor-Adrenalin rief noch bei 0,25 γ/kg eine leichte, flach verlaufende Steigerung des Druckes ohne Änderung der Potentiale hervor, die gleiche Menge Adrenalin verursachte dagegen eine Senkung mit gleichzeitigen Mehrentladungen des Nerven.

Bei der Zusammenstellung der Ergebnisse vermerkte ich schon, daß die Reaktion auf Vasopressin von dem bisher Gesehenen zum Teil abwich. Die anfangs gegebene Menge von 1 VE/kg führte zu einem Anstieg des Blutdruckes, der von einer Hemmung der Nervenentladungen begleitet war, die weit über den Zeitraum der „Adrenalin-Pause" hinausging. Selbst dann, wenn der Druck bereits wieder zur Ausgangshöhe zurückgekehrt war, konnte noch eine Verminderung der Zahl der Aktionspotentiale gesehen werden. Dieser Effekt trat auch bei kleinen Vasopressin-Mengen, die keine oder nur eine sehr geringe Blutdruckwirkung hatten, auf. Eine direkte Druckbelastung der Pressoreceptoren konnte hierbei nicht erfolgt sein. Ob Änderungen der Wandspannung eine Rolle spielten ([22,23,24,25,29]), konnte nicht entschieden werden.

Die vermehrten Impulse nach Gabe von Histamin, Acetylcholin und der Entblutung können als eine Anpassung der, vermutlich vasoconstrictorischen, Nerven an den gesenkten Blutdruck angesehen werden. Die Normalisierung erfolgte nach Histamin später als nach Acetylcholin. Die Ursache für die Senkung nach Acetylcholin und die Vermehrung der Aktionspotentiale ist wohl die Erweiterung der Arteriolen und die Erregungssteigerung in den postganglionären Neuronen. Dieser Effekt trat auch bei der Durchbrechung der „Adrenalin-Pause" auf.

Die sympathicolytische Wirkung des Regitins war gegenüber Adrenalin ausgeprägter als gegenüber Nor-Adrenalin. Dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnissen von Gross, Tripod u. Meier[18]. Dem Verhalten des Blutdruckes entsprach das der Nervenpotentiale. Sie wurden durch Regitin-Nor-Adrenalin weniger verändert als durch Regitin-Adrenalin. Zu einer Blockade der sympathischen Schaltstellen

kam es durch Regitin nicht, vor und einige Zeit nach der Injektion waren die Impuls-Salven gleich.

Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß bei der Katze ein Reflexmechanismus besteht, der von den Receptoren des Carotissinus und des Aortenbogens bis zu den Nierennerven führt. In allen Versuchen trat die nervöse Reaktion erst nach Beginn der Blutdruckveränderungen auf. Sie kann demnach als deren Folge, aber nicht als ihre Ursache angesehen werden.

Zusammenfassung

1. An Katzen in Chloralose-, Chloralose-Urethan- oder Numal-Narkose wurde das Verhalten der Aktionspotentiale der Nierennerven untersucht. Die abgeleiteten Potentiale liefen efferent und bestanden bei Tieren mit normalem Blutdruck und intaktem Kreislauf aus herzsynchronen Impuls-Salven.

2. Die Ausschaltung des Parasympathicus und die Decerebration veränderten die Form der Entladungen nicht.

3. Während der Asphyxie, der Carotisabklemmung und der Entblutung war die Aktivität der Nerven gesteigert.

4. Blutdrucksteigernde Verbindungen hatten eine Hemmung, senkende eine Vermehrung der Nervenimpulse zur Folge.

5. Die Hemmung trat im allgemeinen nur bei plötzlichen Drucksteigerungen auf. Eine Ausnahme davon machte Vasopressin, das schon in geringer Dosierung die Zahl der Aktionspotentiale verringerte.

6. Die Entladungspause nach Adrenalin konnte durch Acetylcholin durchbrochen werden.

7. Weitere Ergebnisse von Untersuchungen mit einem Sympathicolyticum und Curare werden beschrieben.

Literatur

[1] Adrian, E. D., D. W. Bronk and G. Phillips: J. of Physiol. **74**, 115 (1932). — [2] Bernard, C.: Leçons sur les propriétés physiologiques et les alterations pathologiques de l'organisme. II. Paris 1895. — [3] Berne, R. M.: Amer. J. Physiol. **171**, 148 (1952). — [4] Berne, U. M., W. K. Hoffman jr., A. Kagan and M. N. Levy: Amer. J. Physiol. **171**, 564 (1952). — [5] Bronk, D. W., and G. Stella: J. Cell. a. Comp. Physiol. **1**, 113. — [6] Bradford, J.: J. of Physiol. **10**, 358 (1898). — [7] Buhton-Opitz, A., u. D. R. Lucas: Pflügers Arch. **123**, 553 (1908). — [8] Carrel, et Gurthrie: C. r. Soc. Biol. (Paris) **57**, 669 (1905). — [9] Celander, O.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **32**, Suppl. 116 (1954). — [10] Cohnheim, u. Roy Virchows Arch. **92**, 424 (1883). — [11] Ellinger, Ph.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **90**, 77 (1921). — [12] Ellinger, Ph., u. A. Hirt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **106**, 135 (1925). — [13] Euler, U. S. von, G. Liljestrand u. Y. Zottermann: Acta physiol. scand. (Stockh.) **1**, 383 (1941). — [14] Euler, U. S. von, G. Liljestrand u. Y. Zotterman: Acta physiol. scand. (Stockh.) **2**, 1 (1941). — [15] Euler,

U. S. von, u. Y. Zotterman: Acta physiol. scand. (Stockh.) **4**, 13 (1942). — [16] Gernandt, B., G. Liljestrand u. Y. Zotterman: Acta physiol. scand. (Stockh.), **11** 230 (1946). — [17] Gernandt, B., u. Y. Zotterman: Acta physiol. scand. (Stockh.) **11**, 301 (1946). — [18] Gross, F., J. Tripod u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 352. — [19] Hartmann, H., S. L. Ørskow u. H. Rein: Pflügers Arch. **238**, 239 (1937). — [20] Hering, H. E.: Der Karotissinusreflex auf Herz und Gefäße. Dresden und Leipzig 1927. — [21] Heymans, C.: Le sinus carotidien, Paris: G. Dion Verl. 1933. — [22] Heymans, C., et G. van den Heuvel-Heymans: Arch. internat. Pharmacodynamie **53**, 520 (1950). — [23] Heymans, C, and G. van der Heuvel-Heymans: Circulation (New York) **4**, 581 (1951). — [24] Heymans, G., et C. van den Heuvel-Heymans: Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 95 (1953). — [25] Heymans, C., and G. van den Heuvel-Heymans: Circulation (New York) **1**, 3 (1953). — [26] Hirt, A.: Z. Anat. **73**, 621 (1924). — [27] Jost, W.: Z. Biol. **64**, 441 (1914). — [28] Landgren, S.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **26**: 1 (1952) — [29] Landgren, S., E. Neil u. Y. Zotterman: Acta physiol. scand. (Stockh.) **25**, 24 (1951). — [30] Mauerhofer, F.: Z. Biol. **68**, 31 (1917). — [31] Pickford, M.: Pharmacol. Rev. **4**, 254 (1952). — [32] Schneider, M., u. E. Wildbolz: Z. Urol. **43**, 1 (1937).

Dr. Robert Engelhorn,
Biberach/Riss Pharmakolog. Labor der Fa. Dr. Karl Thomae

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 235—245 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Universität, Pécs (Ungarn)
(Direktor: Prof. Dr. J. Méhes)

Über die Veränderungen des Leberzellstoffwechsels bei CCl_4-Vergiftung*

Von

L. Decsi, J. Méhes und F. Varga

(Eingegangen am 20. Mai 1957)

Obwohl über die leberschädigende Wirkung von CCl_4 in der letzteren Zeit mehrere Mitteilungen erschienen, dennoch besteht zur Zeit noch keine einheitliche Auffassung über den Mechanismus der Vergiftung. Nach Himsworth u. Glynn ist die Leberverfettung die Folge einer durch Gefäßspasmen hervorgerufenen Anoxie. Nach Christie u. Judah steht die Leberverfettung mit einer strukturellen Desorganisation der Mitochondrien im Zusammenhang, infolge deren die energieliefernden Enzymsysteme der Zellen geschädigt werden. Andere Autoren, wie Frunder u. Richter, Prosiegel, betonen, daß ein starkes Absinken des Leber-DPN-Gehalts bei den durch verschiedene Diäten oder durch CCl_4 hervorgerufenen Verfettungen eine wichtige Rolle spielt. Auch das Absinken des CoA-Gehalts der vergifteten Leber (Severi u. Fonnesu, Heim u. Mitarb.) kann bei der Auslösung der Verfettung eine bedeutende Rolle spielen, und dasselbe gilt für die Senkung im Gehalt an SH-Gruppen (Binet u. Mitarb.).

Das Ziel unserer Untersuchungen war, zu entscheiden, ob eine Schädigung der energieliefernden oder energieverbrauchenden Enzymprozesse in der Rattenleber nach CCl_4-Vergiftung nachgewiesen werden könne, und ob die Leberveränderungen durch die etwaigen biochemischen Schädigungen erklärt werden könnten.

Methodik

Als Versuchstiere dienten 140—180 g schwere weiße Ratten aus eigener Inzucht. Kost: Brot, Milch, gekochter Mais, Küchenabfälle und Wasser ad libitum. Die Tiere erhielten eine einmalige s. c. CCl_4-Injektion in einer Dose von 0,4—0,5 ml/100 g, ohne Vehikel. Durch Verabreichung dieser relativ großen Gaben wollten wir erreichen, daß die Enzymaktivitätsänderungen besser zutage kommen. Die Tiere hungerten 18 Std lang vor den Versuchen.

* Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Ungarischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt.

A. Enzymatische Methoden

Die Bestimmung der *ATPase-Aktivität* erfolgte nach DuBois-Potter.

Pyrophosphataseaktivität. Medium: 0,01 *M* Veronal HCl-Puffer (p_H 7,4), 0,005 *M* $MgCl_2$, 0,15 *M* $Na_4P_2O_7$, 1 ml Homogenat (entsprechend 4 mg Gewebe). Gesamtvolumen 4 ml, Inkubationszeit 15 min, bei einer Temperatur von 38° C. Enteiweißung mit 1 ml 20%iger Trichloressigsäurelösung.

Alkalische Phosphatase. Medium: 0,01 *M* Veronal-HCl-Puffer (p_H 9,6), 0,06 *M* $MgCl_2$, 0,02 *M* Na-beta-glycerophosphat. 50 mg Gewebe, Gesamtvolumen 5 ml, Inkubationszeit 60 min. Enteiweißung wie oben.

Säurephosphatase. Medium: 0,05 *M* Acetat-Puffer (p_H 4,7), 0,02 *M* Na-beta-glycerophosphat. 50 mg Gewebe, Gesamtvolumen 5 ml. Inkubationszeit 30 min. Enteiweißung wie oben.

Die Bestimmung der *Bernsteinsäuredehydrogenaseaktivität* erfolgte nach der Methode von Kun u. Abood. Im Hauptraum des Thunberg-Gefäßes wurden 0,02 *M* Phosphatpuffer (p_H 7,4), 0,06 *M* Na-succinicum und 1 ml Homogenat (= 100 mg Gewebe) eingesetzt. Gesamtvolumen 3 ml. In dem Seitenarm 1 ml 1% TTC. Nach Evakuierung der Gefäße stellten wir diese in Wasserbad von 38° C. Nach 3 min wurde das TTC in den Hauptraum gegossen. Reaktionszeit 15 min. Das gebildete Formazan wurde mit Aceton extrahiert und fotometrisch bestimmt.

Messung der Phosphatestersynthese. Medium zur Homogenisierung: 0,062 *M* KCl, 0,031 *M* $MgSO_4$, 0,008 *M* Nicotinsäureamid und 0,046 *M* NaF. Zur Messung der Phosphataufnahme diente das folgende Medium: 0,062 *M* KCl, 0,0072 *M* $MgSO_4$, 0,01 *M* Phosphatpuffer (p_H 7,4), 0,012 *M* $NaHCO_3$, 0,02 *M* Na-pyruvicum, 0,002 *M* Na-Malicum, 0,0052 *M* Nicotinsäureamid, 0,03 *M* NaF, und 0,0065 *M* ADP-Na. 2,5 ml des oberen Mediums und 0,9 ml Homogenat (= 160—180 mg Gewebe) wurden in kleine Erlenmeyer-Kolben eingeführt. Zwei Gefäße wurden sofort, die anderen erst nach Inkubation 20 min lang bei 38° C mit 5 ml 5% Trichloressigsäure enteiweißt, und der anorganische Phosphatgehalt nach der Methode von Lowry-Lopez bestimmt. Als Maß der Phosphatestersynthese betrachteten wir die verschwundene Menge des anorganischen Phosphats. Alle Manipulationen wurden in mit Eis gekühlten Gefäßen und mit eiskalten Lösungen durchgeführt.

Die Messung des Brenztraubensäureverbrauches geschah an Homogenaten, in Krebsphosphatlösung. Gewebsmenge rund 200 mg, Inkubationszeit 30 min bei 38° C.

Die Messung der O_2-Aufnahme erfolgte mit der üblichen *Warburg-Methode.* Die Homogenisierung wurde im entsprechenden *Medium A*, oder *Medium B* ausgeführt. *Medium A:* Die übliche *Krebs*-Phosphatlösung mit 0,02 *M* Substrat und 0,002 *M* Na-malicum. *Medium B* („Kaliumreiches Medium"): 0,035 *M* NaCl, 0,054 *M* KCl, 0,013 *M* $NaHCO_3$, 0,01 *M* $MgSO_4$, 0,003 *M* KH_2PO_4, 0,012 *M* Na_2HPO_4, 0,002 *M* Na-malicum und der entsprechende Substrat in einer Endkonzentration von 0,02 *M*.

B. Chemische Methode

Bestimmung der säurelabilen Phosphatfraktionen. Das Tier wurde dekapitiert. Nach möglichst schnellster Herausnahme eines Leberstückes wurde dasselbe in Trockeneis-Äthergemisch geworfen. Das gefrorene Leberstück wurde mit eiskaltem destilliertem Wasser homogenisiert, dann mit eiskalter 10% Trichloressigsäure (oder mit 6% Überchlorsäure) enteiweißt. Das „wahre anorganische Phosphat" wurde nach der Methode von Lowry-Lopez oder durch Ausfällung mit Calcium (Fiske u. Subbarow 1929), der APP-Gehalt durch salzsäure Hydrolyse bestimmt.

Die Bestimmung des Kreatinphosphats geschah parallel mit drei Methoden, und zwar:

a) aus der Differenz des nach Fiske-Subbarow (1925) direkt bestimmbaren und des nach Lowry-Lopez erhaltenen anorganischen Phosphatwertes;

b) aus der Differenz des nach Fiske-Subbarow direkt bestimmbaren und des mit Calcium bei p_H 8,8 ausfällbaren wahren anorganischen Phosphatwertes, und

c) aus der Differenz des nach Lowry-Lopez (oder mit der Calcium-Methode) bestimmten Phosphatwertes vor und nach 15 min langer Inkubation des sauren Filtrates bei 38° C.

Die Methode von Alexejeva — die die meist spezifische und wahrscheinlich auch die beste Methode für Kreatinphosphatbestimmung ist, — konnten wir in unseren Versuchen nicht verwenden, da sich die Farbentwicklung des Kreatininpikrats in Anwesenheit von sauerem Leberextrakt verzögerte. Allerdings haben wir diese Methode im Falle von Muskelgewebe als sehr brauchbar gefunden.

Brenztraubensäure wurde nach der Methode von Friedemann u. Haugen bestimmt.

Gesamtlipoidbestimmung. 0,5—1 g Leber wurde mit Äthanol-Petroläthergemisch (3 : 1) homogenisiert, 20 min lang stehen gelassen und zentrifugiert. Das Sediment wurde mit diesem Gemisch 2 min lang bei 70° C wieder extrahiert und zentrifugiert. Dieses Verfahren wurde noch einmal wiederholt, die Extrakte zusammengegossen und bei 80° C abgedampft. Die Lipoide, und gleichzeitig auch das als Zentrifugatsediment zurückbleibende entfettete Gewebe wurden bei 105° C getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Wassergehalt der Leber wurde durch 8 Std langer Trocknung bei 105° C bestimmt.

Desoxyribonucleinsäurebestimmung erfolgte nach der Methode von Ceriotti.

Die Phosphatbestimmung bei Messung der Phosphataseaktivitäten geschah nach Fiske-Subbarow.

C. Chemikalien

ATP wurde in einem Teil der Versuche nach der Methode von LePage hergestellt, in anderen wurden handelsübliche Präparate verwendet. ADP wurde ebenfalls nach der Methode von LePage hergestellt.

Hexokinase aus Hefe wurde nach Berger u. Mitarb., ATP-ase aus Kaninchenmuskel nach Bailey, Azentontrockenpulver aus Leber nach Gordon hergestellt.

Die verwendeten *Chemikalien* waren käufliche „pro analysi" Präparate von Firmen Merck; Fluka; Light und Chinoin.

Versuchsergebnisse

Bei in vitro Versuchen an krankhaft veränderten Organen, deren chemische Zusammensetzung von den Normalwerten stark abweicht, bereitet die Wahl einer geeigneten Bezugsbasis Schwierigkeiten. 24 Std nach der Vergiftung mit CCl_4 ändert sich nämlich:

1. das Feuchtgewicht der Leber (von 3,7 g/100 g Tier auf 4,7 g/100 g);
2. der Wassergehalt (von 71,4 % auf 75,2 %);
3. die Gesamtlipoid-Menge (von 4,4 % auf 7,2 %);
4. der Eiweißgehalt sinkt von 20,0 % auf 17 %, und
5. der Desoxyribonucleinsäuregehalt von 0,27 % auf 0,23 %.

Diese Werte verändern sich stufenweise, der Gipfelpunkt wird am 3. Tage erreicht. Am 6. Tag unterscheiden sich die Werte von den der normalen Leber kaum oder überhaupt nicht.

Wenn z. B. die Änderungen des Feuchtgewichts nicht in Betracht gezogen werden, scheinen die etwaigen Abnahmen der Enzymaktivitäten

viel ausgeprägter, und Zunahmen derselben viel mäßiger als sie in Wirklichkeit sind. Auch der Eiweißgehalt des Lebergewebes kann nicht als eine geeignete Bezugsbasis betrachtet werden, da die Enzymaktivitätsveränderungen und der Eiweißverlust nicht Hand in Hand gehen (Rosenthal u. Mitarb.). Nach Tsuboi u. Stowell, *sowie auch nach unseren eigenen Ergebnissen ist das fettfreie Trockengewicht die geeignetste Bezugsbasis, weil diese sich während der Vergiftung kaum verändert* (Tab. 1). *So wurden unsere Versuchsergebnisse auf fettfreies Trockengewicht berechnet.*

Tabelle 1. *Änderungen in Zusammensetzung der Leber nach 0,5 ml/100 g CCl_4*

	Zeit nach der Vergiftung				
	Kontrollen	24 Std	48 Std	72 Std	144 Std
Feuchtgewicht g/100 g Tier	3,70 (20)	4,57 (9)	4,35 (12)	4,26 (9)	3,72 (11)
Entfettetes Trokkengewicht in % des Feuchtgewicht.	22,2 (9)	17,6 (5)	18,9 (6)	19,8 (4)	21,6 (4)
Entfettetes Lebertrockengewicht g/100 g Tier	0,82 (9)	0,805 (5)	0,822 (6)	0,845 (4)	0,810 (4)

In Klammern: Zahl der Tiere.

A. O_2-Verbrauch

Es kann 24 Std nach der Vergiftung eine 40 % ige Senkung der Gewebs-Atmung beobachtet werden. Die Atmungsgröße normaler Leber wird erst am sechsten Tage wieder erreicht. In Versuchen mit verschiedenen Substraten ist die Abnahme des O_2-Verbrauchs nur bei Glucose signifikant.

Die Bernsteinsäureoxydaseaktivität verändert sich während der Vergiftung nicht (QO_2 normaler Leber = 13,8, QO_2 vergifteter Leber = 14,6). Auch in der Bernsteinsäuredehydrogenaseaktivität gibt es keine Differenz zwischen normalen und vergifteten Tieren (33,9 bzw. 36,1 mg Formazan/g entfettetes Trockengewicht/h).

Wenn dem Homogenat ein ATPasepräparat aus Kaninchenmuskel hinzugefügt wird, so zeigt die Atmung der vergifteten Rattenleber eine bedeutende Erhöhung, während die der normalen Leber sich nicht verändert (Tab. 2). Wir kamen zum selben Ergebnis, wenn statt Kaninchenmuskel-ATPase ein aus Hefe isoliertes Hexokinasepräparat dem Homogenat zugefügt wurde.

Die O_2-Aufnahme der geschädigten Leber ist im kaliumreichen Medium auf das gleiche Niveau wie die der normalen Leber erhöht (Tab. 3).

Als ein Zeichen für die Fähigkeit vergifteter Zellen, die zugeführten Substrate zu utilisieren, verglichen wir den Brenztraubensäureverbrauch normaler und vergifteter Leber. Die verbrauchten Pyruvatmengen waren bei geschädigten Lebern 167 mg/g fettfreies Trockengewicht/Std (9 Tiere), bei normalen Lebern 158 mg/g fettfreies Trockengewicht/Std (12 Tiere). Diese Versuche wurden 24 bzw. 72 Std nach der Vergiftung durchgeführt.

Tabelle 2. *Einfluß von ATPase auf die endogene Atmung*

	QO_2		P
	ohne ATPase	mit ATPase	
Kontrollen	3,55 ± 0,22 (9)	4,02 ± 0,37 (4)	> 0,20
24 Std nach Vergiftung	2,10 ± 0,36 (8)	4,63 ± 0,36 (9)	< 0,001

In Klammern: Zahl der Versuche.

Tabelle 3. *Einfluß des Mediums auf die O_2-Aufnahme der Leberhomogenate*
Substrat: Na-pyruvicum.

QO_2 Kontrollen		QO_2 24 Std nach CCl_4-Vergiftung	
Medium A	Medium B	Medium A	Medium B
4,83 ± 0,19 (7)	8,13 ± 0,85 (8)	4,21 ± 0,49 (8)	10,48 ± 0,45 (8)

A = Krebs-Phosphatlösung B = Kaliumreiches Medium.

B. Phosphatestersynthese

Nach den oben erwähnten Versuchen zeigt das Oxydationssystem der Leber der mit CCl_4 vergifteten Tiere keine wesentliche Schädigung. Deswegen haben wir untersucht, ob die Phosphatestersynthese, die eine der empfindlichsten biochemischen Reaktionen ist, beeinflußt wird. Wie aus Tab. 4 ersichtlich, ist die Phosphatestersynthese in vergifteten Lebern nicht vermindert, sondern erhöht.

C. Energiereiche Phosphatverbindungen

24 Std nach der CCl_4-Verabreichung ist der Kreatinphosphatgehalt der Leber etwa zwölfmal so groß wie bei normalen Tieren. Demgegenüber vermindert sich der anorganische Phosphatgehalt, während der APP-Gehalt kaum verändert wird (Tab. 5).

Was den sehr hohen Kreatinphosphatgehalt betrifft, schien es uns fraglich, ob die beobachtete Zunahme tatsächlich nur auf eine Zunahme des Kreatinphosphats zurückzuführen ist. Auf Grund von Versuchen,

Tabelle 4. *ATP-Synthese von normalen und vergifteten Leberhomogenaten*
Substrat: Na-pyruvicum

	Gegildetes ATP in μM/g entfettetes Trockengewicht/Std	Diff. %	p
Kontrollen	496 ± 45 (8)	—	—
CCl_4 24 Std nach Vergiftung	855 ± 39 (9)	+ 72%	< 0,001

In Klammern: Zahl der Versuche.

Tabelle 5. *Änderungen im Leberphosphatspiegel nach CCl_4-Vergiftung*

	Kontrollen	24 Std	48 Std	72 Std	144 Std
Anorg. P.[3]	128,2 ± 16,0 (6)	108,1 ± 9,0[2] (9)	84,9 ± 5,5[1] (10)	145,0 ± 8,0 (10)	113,0 ± 3,5 (3)
KrP[3]	7,06 ± 0,87 (6)	85,0 ± 12,4[1] (9)	125 ± 10,0[1] (10)	58,4 ± 11,5[1] (10)	45,7 ± 3,3[1] (3)
APP[3]	57,2 ± 11,0 (6)	67,1 ± 6,2 (9)	53,9 ± 4,4 (10)	55,3 ± 3,6 (10)	—

In Klammern: Zahl der Versuche.
[1] = $p < 0{,}001$; [2] = $p < 0{,}01$; [3] = P mg/100 g entfettetes Trockengewicht.

die hier nicht näher besprochen werden sollen, sind wir der Meinung, daß von dem in vergifteten Lebern gefundenen „Kreatinphosphat" tatsächlich nur ein Teil als solches vorliegen kann (höchstens 50%). Der andere Teil soll eine — nicht näher identifizierte — Phosphatverbindung darstellen, die bei einer Azidität unter p_H 3 ebenso rasch wie Kreatinphosphat hydrolisiert wird, und sich durch Calcium bei p_H 8,8 nicht ausfällen läßt. Diese sehr labile Phosphatverbindung konnten wir bisher nicht näher identifizieren, deshalb wurde auch diese als Kreatinphosphat bezeichnet. So bedeuten die in dieser Arbeit gegebenen Kreatinphosphatwerte die Summe des Kreatinphosphats und dieser nicht näher identifizierten Phosphatverbindung.

D. Phosphatasen

Die ATPase und sauere Phosphataseaktivität der Leberzellen wird durch CCl_4-Vergiftung bedeutend herabgesetzt, während die alkalische Phosphatase- und Pyrophosphataseaktivität kaum verändert wird (Tab. 6). Wollemann u. Feuer haben nachgewiesen, daß in einem

Tabelle 6. *Änderungen der Phosphataseaktivitäten in Leber nach CCl_4-Vergiftung*

Zeit nach Vergiftung	Alkalische Phosphatase$_4$	Säure Phosphatase$_4$	Pyro-Phosphatase$_4$	ATPase$_4$
Kontrolle	5,70 ± 0,43 (15)	36,3 ± 1,8 (16)	815 ± 29 (14)	288 ± 18 (11)
24 Std	5,53 ± 0,79 (4)	26,7[2] ± 2,38 (4)	794[3] ± 73 (7)	214[2] ± 28 (7)
48 Std	5,12[3] ± 0,53 (4)	26,7[1] ± 1,93 (4)	773[3] ± 68 (4)	175[1] ± 12 (9)
72 Std	5,25[3] ± 0,45 (4)	18,8[1] ± 1,95 (4)	— —	193[1] ± 6 (9)
144 Std	5,22[3] ± 0,44 (8)	37,2 ± 1,77 (8)	780[3] ± 93 (4)	298 ± 14 (4)

In Klammern: Zahl der Versuche.
[1] = $p < 0{,}001$; [2] = $p < 0{,}01$; [3] = $p > 0{,}05$;
[4] = ΔP mg/g entfettetes Trockengewicht/Std.

wäßrigen Gehirnhomogenat neben der hydrolytischen Spaltung des ATP auch die Phosphorylierung des CoA (durch ATP) stattfindet. Diese Reaktion spielt sich in zwei Stufen ab:

$$1.\ \text{ATP} + \text{CoA} \longrightarrow \text{P-CoA} + \text{ADP}$$

$$2.\ \text{P-CoA} \xrightarrow[\text{Hydrolyse}]{} \text{P} + \text{CoA}$$

und führt ebenso zur Freisetzung eines Phosphats aus ATP, wie die hydrolytische ATP-Spaltung. Diese Transphosphorylierung und die hydrolytische Spaltung des ATP kann in folgender Weise voneinander getrennt werden: Im Azetontrockenpulver geht die „wahre" hydrolytische ATPase zugrunde und nur die Phosphorylierung des CoA bleibt erhalten. Dagegen findet in einem dialysierten Homogenat nur die hydrolytische ATP-Spaltung statt. Sind diese am Gehirn gewonnenen Resultate auch für Lebergewebe verwendbar, so mag aus unseren diesbezüglichen Versuchen der Schluß gezogen werden, daß *durch CCl_4-Vergiftung nicht die hydrolytische ATPase, sondern die Phosphatübertragung von ATP auf CoA geschädigt wird* (Tab. 7).

Über die Bedeutung der Abnahme in der saueren Phosphataseaktivität kann zur Zeit noch nichts gesagt werden.

Tabelle 7. *ATPase und ATP-CoA-Phosphoferaseaktivität der Leberzellen 72 Std nach CCl_4-Vergiftung*

	Kontrollen	CCl_4	Diff. %	p
Homogenat[1]	$288 \pm 8{,}2$ (16)	191 ± 15 (14)	— 33,6	$< 0{,}001$
Dialysat (Hydrolytische ATPase)[1]	$101 \pm 1{,}5$ (13)	101 ± 4 (14)	∅	—
Acetonpulver (Phosphatübertragung von ATP auf CoA)[2]	$34{,}7 \pm 1{,}3$ (13)	$22{,}1 \pm 0.9$ (14)	— 36,2	$< 0{,}001$

In Klammern: Zahl der Versuche.
[1] = ΔP mg/g entfettetes Trockengewicht/Std; [2] = ΔP mg/g Azetonpulver/Std.

Diskussion

Aus den oben vorgelegten Versuchsergebnissen sollen zwei zentrale Fragen hervorgehoben werden. Die erste Frage bezieht sich auf das Verhalten der *Zelloxydationsprozesse* in der Leber CCl_4-vergifteter Ratten. Diesbezügliche Literaturangaben sind ziemlich widersprechend. Im O_2-Verbrauch wurde ein 60—70%iges Absinken, ja aber auch eine 50%ige Steigerung an denselben Tierarten beobachtet (Ennor, Christie u. Judah, Tsuboi u. Stowell 1951b, Frunder u. Friedel, Richter).

In unseren Versuchen wurde die Wirkung von großen CCl_4-Gaben untersucht. Obwohl die chemische Zusammensetzung der Leber bestimmte Änderungen aufwies (Zunahme des Wasser- und Fettgehaltes, Absinken des Eiweißgehalts usw.) und auf dieser Grundlage gewisse Schädigungen der Zelloxydationsprozesse erwartet werden könnten, zeigten unsere Versuche eindeutig, daß zwischen dem O_2-Verbrauch normaler und CCl_4-vergifteter Rattenleber kein Unterschied besteht, wenigstens bei Anwendung von Citrat, Pyruvat oder Succinat als Substrat. Auch der Brenztraubensäureverbrauch der Leberzellen bleibt nach CCl_4 unverändert.

Ein Absinken konnte nur in der endogenen Atmung, bzw. in der mit Glucose gemessenen O_2-Aufnahme beobachtet werden. (Die letztere ist eigentlich auch eine endogene Atmung, da die Leber die Glucose als Atmungssubstrat nur in sehr beschränktem Maße ausnützen kann.) Die in diesem Zusammenhang zu beantwortende Frage lautet: Bedeutet das Absinken der endogenen Atmung eine tatsächliche Schädigung des Oxydationsystems oder nicht? Wir versuchten diese Frage auf Grund der folgenden Überlegungen zu beantworten. Die O_2-Aufnahme der Gewebe kann unter bestimmten Bedingungen etwa auf die zweifache jener Werte gesteigert werden, welche man in der üblichen Krebs-Phosphatlösung

beobachten kann. So kann eine etwa 100% ige Atmungssteigerung durch Erhöhung der Kaliumkonzentration (auf 0,05—0,07 *M*), durch Dinitrophenol (5—10 μg/ml) oder durch elektrische Reizung in vitro ausgelöst werden. Aus diesen Beobachtungen läßt sich der Schluß ziehen, daß die Zellen in Krebs-Phosphatlösung nur 50% ihrer Vollkapazität entfalten, d. h. die Aktivität des Oxydationssystems liegt unter diesen Umständen wohl unter dem Maximum. Durch diese funktionellen Reserven des Zelloxydationssystems kann in Krebs-Phosphatlösung auch dann noch eine unveränderte O_2-Aufnahme gefunden werden, wenn infolge pathologischer Schädigungen sogar ein 50% iger Funktionsausfall des Oxydationssystems vorliegt.

Auf Grund dieser Überlegungen versuchten wir die O_2-Aufnahme der CCl_4-vergifteten Leber einer weiteren Funktionsprüfung zu unterwerfen. Wir setzten die Leberzellen in ein kaliumreiches Medium, in welchem die O_2-Aufnahme der Kontrollen ungefähr verdoppelt wird. Ist das Oxydationssystem geschädigt, so muß dessen Schädigung besser zum Ausdruck kommen, d. h. es darf keine Steigerung des O_2-Verbrauches in diesem Medium auftreten. Doch zeigten unsere Versuche, daß im kaliumreichen Medium die O_2-Aufnahme auch der vergifteten Leber die Atmung der normalen Leber erreicht. Dies mag bedeuten, daß das Oxydationssystem der CCl_4-vergifteten Leber zur gleichen Leistung fähig ist als das der normalen Leber. Diese Tatsache kann nach unserer Meinung in der Weise erklärt werden, daß die CCl_4-Vergiftung in dem Oxydationssystem der Leberzellen keine prinzipielle Schädigung verursacht. Auch die Beobachtung von Fukugita unterstützt diese Annahme. Er konnte nämlich in in vitro-Versuchen nachweisen, daß Dinitrophenol an CCl_4-vergifteten Lebern die gleiche Zunahme des O_2-Verbrauchs hervorruft, wie an normalen Lebern. Das Intaktbleiben der Oxydationsprozesse ist auch durch unsere Versuche über Brenztraubensäureverbrauch bewiesen, nämlich: die vergifteten Zellen verbrauchen gleiche Mengen von Brenztraubensäure wie die normalen.

Es bleibt aber die Frage offen, warum die endogene Atmung der vergifteten Leberzellen immerhin niedriger ist, als die der normalen. Wie es später noch besprochen wird, zeigt der energiereiche Phosphatgehalt der vergifteten Leber eine bedeutende Zunahme, während der anorganische Phosphatgehalt niedriger ist als bei Normaltieren. Andererseits ist es wohl bekannt, daß die O_2-Aufnahme durch den Phosphatacceptorspiegel in entscheidender Weise beeinflußt wird. So versuchten wir die O_2-Aufnahme vergifteter Leberzellen durch Erhöhung des gesenkten Phosphatacceptorspiegels zu normalisieren. Zu diesem Zwecke verwendeten wir ein aus Kaninchenmuskel hergestelltes ATPasepräparat, sowie eine aus Hefe isolierte Hexokinaselösung. Durch Zugabe von ATPase oder Hexokinase wird die O_2-Aufnahme normaler Leberzellen gar nicht beeinflußt, die der

vergifteten Leberzellen dagegen auf die Werte der normalen Leber erhöht. Diese Beobachtung beweist wiederum, daß die Oxydationsprozesse in der vergifteten Leber intakt bleiben, und daß die eventuelle Abnahme des O_2-Verbrauches nicht als Folge etwaiger Schädigungen, sondern vielmehr als eine sekundäre Erscheinung, als Ausdruck einer cellulären Regulation aufzufassen ist.

Die andere Frage, die hier diskutiert werden soll, ist die weitere Verwertung der durch Oxydationsprozesse gewonnenen Energie.

Nach Christie u. Judah läßt sich die nach CCl_4-Vergiftung auftretende Zellschädigung durch eine strukturelle Desorganisation der Mitochondrien in befriedigender Weise erklären. Besteht eine solche strukturelle Desorganisation der Mitochondrien, so kann man mit Recht annehmen, daß die Utilisation der Oxydationsenergie zur Phosphatestersynthese in CCl_4-Vergiftung bedeutend geschädigt wird. Doch zeigten unsere Versuche, wie auch die von Christie u. Judah, daß die Phosphatestersynthese in vergifteten Leberzellen nicht geschädigt wurde, sie ist sogar, in Vergleich zu den Kontrollen, signifikant erhöht. Diese Erhöhung ist aller Wahrscheinlichkeit nach eine Folge der Abnahme der ATPase-aktivität (s. unten).

Eine Schädigung kann also nach CCl_4-Vergiftung weder in den Oxydationsprozessen, noch in den Phosphorylierungsprozessen der Leberzellen nachgewiesen werden. Daß die Phosphorylierungsprozesse intakt sind, wird auch durch die Beobachtung bewiesen, daß der energiereiche Phosphatspiegel in der Leber durch CCl_4-Vergiftung bedeutend erhöht wird, was auch andere Autoren beobachten konnten (Richter; Ennor u. Stocken; Tsuboi, Stowell u. Lee). Diese Erhöhung kann teilweise auf eine KrP-Anhäufung zurückgeführt werden, teilweise aber wird sie durch Vermehrung einer anderen, nicht näher identifizierten, sehr labilen Phosphatverbindung hervorgerufen. Diese Zunahme des energiereichen Phosphatgehaltes könnte man in dem Sinne auffassen, daß durch die CCl_4-Vergiftung eine Störung des ATP-Verbrauchs der Leberzellen hervorgerufen wird. Dafür spricht auch die starke Abnahme der ATPase-aktivität in vergifteten Lebern, was — neben Zunahme des labilen Phosphatspiegels — für das meist charakteristische biochemische Zeichen der CCl_4-Vergiftung gehalten werden kann. Eine weitere Analyse dieser Beobachtung ergab, daß es sich hier nicht um eine Schädigung der „wahren" hydrolytischen ATPase handeln kann, sondern die Phosphatübertragung von ATP auf CoA gestört sei. Diese Frage bedarf noch einer eingehenderen Analyse. Es kann aber schon jetzt aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß dies den einzigen der bisher untersuchten biochemischen Prozesse darstellt, der durch CCl_4 stark geschädigt wird. Für eine Störung des CoA-Systems sprechen auch die Befunde von Heim u. Mitarb., sowie Severi u. Fonnesu, die nachgewiesen haben, daß der

CoA-Gehalt der Leber durch CCl_4-Vergiftung um 60—70 bzw. 30% vermindert wird. Doch ist ein intaktes CoA-System sowie die Energieübertragung von Adenylsäuresystem auf CoA-System für den Zellstoffwechsel offensichtlich von entscheidender Bedeutung, und die Störung dieses Systems kann in der CCl_4-Verfettung der Rattenleber wohl eine Rolle spielen. Dafür sprechen auch die Versuche von Richter, der eine Störung der Energieübertragung von ATP auf das „reagierende System" bei CCl_4-Vergiftung nachweisen konnte.

Zusammenfassung

Die energieliefernden Stoffwechselprozesse der Leberzellen werden durch CCl_4-Vergiftung nicht geschädigt. Eine wesentliche Störung konnte nur in der Phosphatübertragung von ATP auf CoA nachgewiesen werden. Die nach CCl_4-Vergiftung auftretenden Leberveränderungen sind nicht auf eine Schädigung der energieliefernden Prozesse, sondern eher auf eine Störung der Energieverwertung zurückzuführen.

Literatur

Alexejeva, A. M.: Biochimija (Moskau) **16**, 97 (1951). — Bailey, K.: Biochemic J. **36**, 121 (1942). — Berger, L., M. W. Slein, S. P. Colowick and C. F. Cori: J. Gen. Physiol. **9**, 379 (1946). — Binet, L., G. Weller et H. Bonhard: C. r. Soc. Biol. (Paris) **124**, 1141 (1937). — Ceriotti, G.: J. of Biol. Chem. **214**, 59 (1955). — Christie, S., and J. D. Judah: Proc. Roy. Soc. (Lond.) **142**, 241 (1954). — DuBois, K. P., and V. R. Potter: J. of Biol. Chem. **148**, 451 (1943). — Ennor, A. H.: Austral. J. Exper. Biol. and Med. Sci. **20**, 73 (1942). — Ennor, A. K., and L. A Stocken: Nature (Lond.) **159**, 308 (1947). — Fiske, C. H., and Y. Subbarow: J. of Biol. Chem. **66**, 375 (1925); **81**, 629 (1929). — Friedemann, Th. E., and G. A Hangen: J. of Biol. Chem. **147**, 415 (1943). — Frunder, H., u. W. Friedel: Hoppe-Seylers Z. **295**, 79 (1953). — Frunder, H., u. G. Richter: Hoppe-Seylers Z. **299**, 39 (1955). — Fukugita, Shuici: Ronas Berichte über d. ges. Physiol. **120**, 670 (1940). — Gordon, J. J.: Biochemic J. **55**, 812 (1953). — Heim, F., F. Leuschner u. A. Ott: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 360 (1956). — Himsworth, K. P., and L. E. Glynn: Clin. Sci. **5**, 93 (1944). — Kun, E., and L. G. Abood: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 144 (1949). — LePage, G. A.: Biochemical Preparations Vol. I. New York: J. Wiley and Sons 1949. — Lowry, O. H., and J. A. Lopez: J. of Biol. Chem. **162**, 421 (1946). — Prosiegel, R.: Z. exper. Med. **125**, 323 (1955). — Richter, M. L.: J. of Pharmacol. **102**, 94 (1951). — B. Rosenthal, O., C. S. Rogers, H. M. Vars, C. C. Ferguson, J. W. Zerbe and G. Novack: J. of Biol. Chem. **185**, 668 (1950). — Severi, C., and A. Fonnesu: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **91**, 368 (1956). — Tsuboi, K. K., and R. E. Stowell: Cancer Research **11**, 221 (1951). — Tsuboik, K. K., R. E. Stowell and C. S. Lee: Cancer Research **11**, 87 (1951). — Wollemann, M., u. Gy. Feuer: Acta Physiol. (Budapest) **7**, 329 (1955).

Prof. Dr. Julius Méhes, Pharmakol. Inst. d. Med. Univ. Pécs (Ungarn) Rákoczi u. 2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 246—253 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf,
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels am isolierten Darm

Von
W. Rummel, H. Jacobi, K. Pfleger und H. Stupp

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juni 1957)

Die klinische Verwendung tiefer Temperaturen verleiht in neuerer Zeit der Frage nach den Zusammenhängen zwischen Stoffwechsel und Temperatur eine gewisse Aktualität. Dieser Beitrag befaßt sich mit dem Verhalten isolierten Gewebes zwischen 27 und 37° C. Über das regulative Verhalten des intakten Warmblüterorganismus liegt bereits ein umfangreiches Material vor (zusammengefaßt bei: [13,21,23]). Eine Erscheinung, die dabei im Zentrum der Betrachtung steht, ist die Fähigkeit des Homoiothermen, einem Absinken der Körpertemperatur bis zu einem gewissen Grade entgegenzuwirken. Das geht soweit, daß selbst dann noch der Stoffwechsel ansteigt, wenn bereits die Kerntemperatur absinkt, falls 34° C noch nicht unterschritten sind [3,8,9,18,24,25].

Man kann sich nun die Frage vorlegen, ob diese Fähigkeit ausschließlich vom Funktionieren der bekannten Teile des Regulationsapparates, des vasomotorischen, neuromuskulären und humoralen Systems abhängt, oder ob auch der Gewebsstoffwechsel gewisse elementare Eigenschaften besitzt, denen als Voraussetzung für das regulative Verhalten eine Bedeutung zukommt. Da auch nach Ausschaltung des Zitterns sich bis zu 34° die Beziehung von O_2-Verbrauch und Kerntemperatur noch nicht mit einem Q_{10} ausdrücken läßt (Beispiele bei [12,17]), bleibt unter den bekannten Größen für die Erklärung dieses Verhaltens nur noch der hormonale Teil (Schilddrüse) des Regulationsapparates übrig. Die metabolische Wirkung des Schilddrüsenhormons ist sicher ausschlaggebend beteiligt an der Stoffwechselsteigerung bei fallender Temperatur (Literatur bei [19]). Warum ist nun aber dieser Mechanismus unterhalb 34° nicht mehr wirksam? Warum bricht gerade um 34° herum die Temperaturregulation zusammen?

Hieraus entspringt unsere Fragestellung: ist dieser Punkt 34° am isolierten, also von nervösen und vasculären Einflüssen freien Gewebe, ein stoffwechselchemisch ausgezeichneter Punkt [14]? Wir haben zur

Prüfung dieser Frage isolierte Darmstücke von Meerschweinchen gewählt, weil die Stoffwechseluntersuchungen gleichzeitig eine Grundlage für Versuche über Durchtrittsvorgänge sein sollen.

Methode

Der O_2-*Verbrauch* wurde nach der Warburg-Methode bestimmt. Um gleichzeitig bei 4 Temperaturen Messungen durchführen zu können, benützten wir eine Apparatur mit 4 Thermostaten. Die Gefäße wurden alle von einer Achse aus geschüttelt. Zur optimalen O_2-Versorgung erwies sich eine Schüttelfrequenz von 120/min bei einer Amplitude von 5 cm als notwendig! Als Versuchstiere verwendeten wir Meerschweinchen von 120—140 g. In der Atmosphäre hatten wir reinen Sauerstoff. (Vorversuche hatten ergeben, daß man mit Darmstückchen von 120—140 g schweren Tieren von 75% O_2 an aufwärts keine weitere Atmungssteigerung erhält. Die Bedingungen für die Grenzschnittdicke waren also erfüllt. Für die Versuche in der Durchströmungsapparatur konnten auch größere Tiere, bis zu 240 g, benützt werden da sich dort der Darm nicht wie im Warburg-Gefäß zusammenzieht). Die Meerschweinchen wurden durch Genickschlag getötet, der Dünndarm sofort entnommen, in Tyrodelösung von 4° C gegeben, der Länge nach aufgetrennt und in 1 cm lange Stückchen geschnitten. 5—6 solcher Schnitte wurden in ein Warburg-Gefäß gegeben (3 ml Tyrode mit 50 μg Terramycin pro ml, p_H 7,2 zu Anfang und zu Ende des Versuchs, im Einsatz 0,1 ml 10%ige NaOH). Der O_2-Verbrauch wurde 30 min lang gemessen und anschließend das Trockengewicht der Darmschnitte bestimmt.

Die Werte für die *Glucoseabnahme* und *Milchsäurebildung* wurden mit 10 cm langen Dünndarmabschnitten gleichzeitig in 3 Durchströmungsapparaturen nach Fisher u. Parsons[4] mit 27°, 34° und 37° gewonnen, weil sie auch als Unterlagen für die nachfolgenden Untersuchungen über Durchtrittsvorgänge dienen sollten. Die Darmstücke wurden erst nach Beginn der Sauerstoffdurchströmung von der Blutversorgung getrennt (Äthernarkose). Als Suspensionsflüssigkeit wurde ebenfalls Tyrodelösung (innen 68 und außen 50 ml) mit 50 μg Terramycin pro ml verwendet. (Ohne Terramycin entstehen durch Bakterien erhebliche Fehler.) Die Durchströmungsapparatur wurde mit einem O_2-CO_2-Gemisch (95/5) bzw. mit N_2-CO_2-Gemisch (95/5) durchgeblasen, wodurch gleichzeitig die Flüssigkeit innen und außen in Zirkulation gebracht wurde (p_H 7,0). Der Stickstoff wurde durch Pyrogallol geleitet und so vom restlichen Sauerstoff befreit. (Für Magenwand von Ratten geben Lutwak-Mann u. Barrett[16] unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Glucose eine Überlebenszeit von 2—3 Std an). — Glucose und Milchsäure wurden nach 120 min in der Innen- und Außenflüssigkeit bestimmt (Doppelbestimmung; Glucose nach Hagedorn, Jensen bzw Nelson[10]; Milchsäure nach Barker u. Summerson[1]).

Ergebnisse

Es wurden 3 Stoffwechselgrößen, O_2-Verbrauch, Glucoseabnahme und Milchsäurebildung gemessen.

An Schnitten fand die Mehrzahl der Untersucher für den O_2-Verbrauch weder eine einem Q_{10} in strengem Sinne entsprechende logarithmische Beziehung zur Temperatur noch eine eindeutige lineare[6,7,22]. (Das mag wohl teils an einer zu geringen Zahl von Temperaturpunkten, teils an einer relativ hohen Streuung gelegen haben). O'Connor jedoch entnahm seinen Messungen des O_2-Verbrauchs an der Ochsencornea, daß die Atmung auch an isoliertem Gewebe nicht gleichmäßig mit der Temperatur abnimmt, sondern daß ein Gipfel bei 34° C liegt[17] (1950).

Wir selbst fanden für den O_2-*Verbrauch anfänglich*, wenn auch keinen Gipfel bei 34°, so doch erst ab 34° einen steileren Abfall mit der Temperatur. Es stellte sich jedoch bald heraus, daß die Bedingungen für die Grenzschnittdicke nicht erfüllt waren, denn die Darmstückchen hatten zwar ursprünglich in *gedehntem Zustand* die geforderte Dicke, kontrahierten sich aber nach dem Schneiden in den Warburg-Gefäßen. Dadurch kam es,

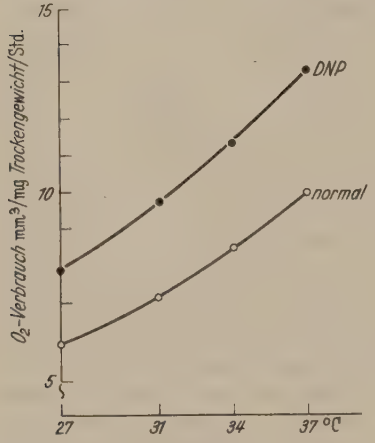


Abb. 1

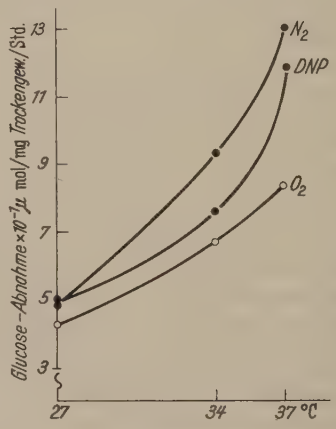


Abb. 2

Abb. 1. Kontrolle: 27° C: M = 5,88 mm³ O_2 (mg Tgw) Std ± 0,37; n = 18
31° C: M = 7,18 mm³ O_2 (mg Tgw) Std ± 0,43; n = 18
34° C: M = 8,57 mm³ O_2 (mg Tgw) Std ± 0,52; n = 18
37° C: M = 9,98 mm³ O_2 (mg Tgw)Std ± 0,53; n = 18
DNP: 27° C: M = 7,97 mm³ O_2 (mg Tgw) Std ± 1,08; n = 14
31° C: M = 9,88 mm³ O_2 (mg Tgw) Std ± 1,61; n = 14
34° C: M = 11,3 mm³ O_2 (mg Tgw) Std ± 2,52; n = 14
37° C: M = 13,25 mm³ O_2 (mg Tgw) Std ± 0,93; n = 14

Abb. 2. DNP: 27° C: M = 5,0 10^{-1} µmol ± 0,52; n = 12
34° C: M = 7,6 10^{-1} µmol ± 0,76; n = 12
37° C: M = 11,9 10^{-1} µmol ± 1,33; n = 12
N_2: 27° C: M = 4,9 10^{-1} µmol ± 0,67; n = 10
34° C: M = 9,3 10^{-1} µmol ± 1,1 ; n = 9
37° C: M = 13,0 10^{-1} µmol ± 1,8 ; n = 11
O_2: 27° C: M = 4,33 10^{-1} µmol ± 0,72; n = 8
34° C: M = 6,71 10^{-1} µmol ± 0,89; n = 9
37° C: M = 8,45 10^{-1} µmol ± 1,0 ; n = 9

daß die Diffusion bei zunehmender Oxydationsrate über 34° zum limitierenden Faktor wurde. Dieser Einwand gilt aber für die Versuchsergebnisse von O'Connor[17] nach Lage der Meßpunkte und Wahl des Objekts (Cornea) nicht.

Bei Verwendung kleiner Meerschweinchen (120—140 g) wirkt sich die Kontraktion der Darmstückchen nicht mehr störend aus. Der Verlauf der Kurve (Abb. 1) entspricht dann auch weitgehend der Theorie. Der Q_{10} liegt sowohl für die Normalatmung als auch für die

durch 2,4 Dinitrophenol (DNP) gesteigerte im Mittel bei 1,7. Nicht nur der Verlauf der durch DNP um 30% erhöhten Atmungskurve, sondern auch eine Prüfung mit sauerstoffärmeren Gemischen ergab, daß die Bedingungen für die Grenzschnittdicke erfüllt sind.

Das Verhalten der *Atmung* ohne und mit DNP in Abhängigkeit von der Temperatur gibt also *keinen* Anhaltspunkt dafür, daß sich der Punkt bei 34° stoffwechselchemisch auszeichnet.

Die folgenden Versuche wurden alle in einer Durchströmungsapparatur durchgeführt, bei der ein kräftiger Sauerstoffstrom eine innere (Mucosaseite) und eine äußere (Serosaseite) Zirkulation betreibt[4]. Es laufen immer 3 Versuche (Darmstückchen von einem Tier) bei 27°, 34° und 37° C parallel.

Die *Glucoseabnahme* in der gesamten Nährflüssigkeit (innen + außen) unter *aeroben* Verhältnissen zeigt eine der Theorie entsprechende Abhängigkeit (Abb. 2). Der Q_{10} beträgt 2. (Wir sprechen bewußt nur von einer Abnahme der Glucose und nicht von einem Verbrauch, weil mehr Glucose verschwindet als der Atmung und Glykolyse entspricht. Unter Abnahme verstehen wir die verschwundene Glucosemenge, die mit einer Reduktionsmethode nicht mehr nachweisbar ist.

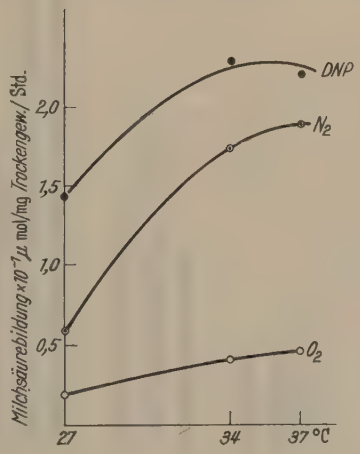


Abb. 3

DNP:	27° C: M = 1,44	10^{-1} µmol ± 0,04;	n = 12
	34° C: M = 2,31	10^{-1} µmol ± 0,16;	n = 12
	37° C: M = 2,23	10^{-1} µmol ± 0,22;	n = 11
N_2:	27° C: M = 0,59	10^{-1} µmol ± 0,07;	n = 12
	34° C: M = 1,76	10^{-1} µmol ± 0,13;	n = 12
	37° C: M = 1,91	10^{-1} µmol ± 0,2 ;	n = 12
O_2:	27° C: M = 0,19	10^{-1} µmol ± 0,03;	n = 9
	34° C: M = 0,43	10^{-1} µmol ± 0,06;	n = 7
	37° C: M = 0,47	10^{-1} µmol ± 0,05;	n = 9

In Gegenwart von 10^{-4} mol DNP verschwindet 40% mehr Glucose. Bei 34° beträgt die Steigerung der Glucoseabnahme nur noch 13% gegenüber der Norm, wie schon bei 27°. Unter diesen Bedingungen kann die Temperaturkurve der Glucoseabnahme nicht korrekt durch einen Q_{10} wiedergegeben werden, da sie von 37° nach 34° steiler abfällt als einem logarithmischen Verlauf entspricht. Benützt man zur Berechnung nur die Werte von 27° und 37°, wie des üblicherweise getan wird, dann ergibt sich ein Q_{10} von 2,4. Die tatsächlichen Verhältnisse werden dabei allerdings nicht ganz berücksichtigt.

Unter *anaeroben* Bedingungen erhöht sich die Glucoseabnahme um 50%. Der Gang mit der Temperatur wird durch einen Q_{10} von 2,7 wiedergegeben. Bei 34° beträgt die Steigerung noch 32%.

Auch beim Verlauf der *Glucoseabnahme* mit der Temperatur tritt der Punkt 34° *nicht* hervor. Unter DNP allerdings ist bei 34° die Glucoseabnahme viel stärker vermindert als der RGT-Regel nach zu erwarten wäre.

Die *Milchsäurebildung* verhält sich mit fallender Temperatur schon unter *aeroben* Bedingungen ganz anders, d. h. die Kurve verläuft gerade umgekehrt, nämlich zwischen 34° und 37° flach und zwischen 34° und 27° steil (Abb. 3). Besonders deutlich wird diese eigenartige Temperaturabhängigkeit der Glykolyse bei *DNP* und unter *anaeroben* Verhältnissen. Der glykolytische Teil des Stoffwechsels läuft mit anderen Worten trotz einer Senkung der Temperatur um 3° (von 37° auf 34°) unvermindert weiter und fällt erst unterhalb — gegen 27° hin — steil ab. Insofern ist für die *Glykolyse* der Punkt 34° ein *ausgezeichneter*.

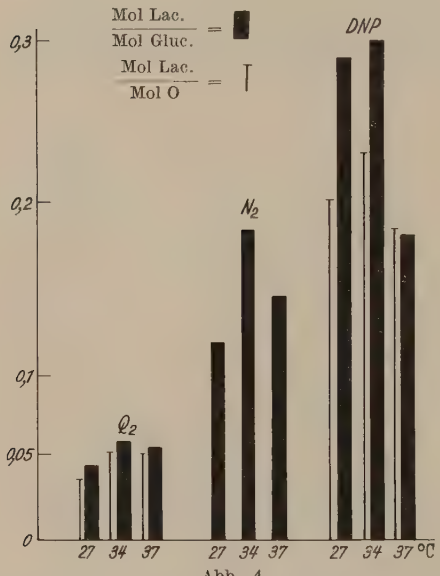


Abb. 4

bei O_2: 27° C: 0,044 · 10^{-1} µmol
34° C: 0,063 · 10^{-1} µmol
37° C: 0,055 · 10^{-1} µmol
N_2: 27° C: 0,12 · 10^{-1} µmol
34° C: 0,19 · 10^{-1} µmol
37° C: 0,15 · 10^{-1} µmol
DNP: 27° C: 0,29 · 10^{-1} µmol
34° C: 0,3 · 10^{-1} µmol
37° C: 0.19 · 10^{-1} µmol
bei O_2: 27° C: 0,033 · 10^{-1} µmol
34° C: 0,057 · 10^{-1} µmol
37° C: 0,053 · 10^{-1} µmol
DNP: 27° C: 0,203 · 10^{-1} µmol
34° C: 0,229 · 10^{-1} µmol
37° C: 0,189 · 10^{-1} µmol

Es kommt zu einer Anhäufung von Milchsäure auf der Serosaseite, die schon Wilson[21] beschrieben hat. Mit der Bedeutung dieser Tatsache für den Glucose-transport befaßt sich eine nachfolgende Mitteilung.

Wenn man die gebildete Milchsäure zur verschwundenen Glucose oder zum verbrauchten Sauerstoff in Beziehung setzt (Abb. 4), dann wird vor allem am Quotienten Milchsäure/Glucose sehr deutlich, daß bei 34° ein relatives Maximum liegt, d. h. bei 34° wird unter *aeroben* Bedingungen — besonders mit DNP — *pro Mol Glucose* bzw. *Sauerstoff mehr Milchsäure* gebildet als bei 37°. Die *aerobe Glykolyse* nimmt also unter DNP mit fallender Temperatur bis 34° zu und erst unterhalb 34° ab. Ohne DNP wird aerob bei guter O_2-Versorgung so wenig Milchsäure gebildet, daß die Mengen der Grenze der Bestimmbarkeit sehr nahe

kommen. Trotzdem zeigen auch hier die Verhältniszahlen für Milchsäure/Sauerstoff an, daß erst unterhalb 34° die aerobe Glykolyse stärker abnimmt. (Wenn für das Verhältnis von Mol Milchsäure zu Mol Sauerstoff für die Milchsäure Werte genommen werden, die in der Durchströmungsapparatur gewonnen und für den Sauerstoffverbrauch solche, die in der Warburgapparatur gemessen wurden, dann dürfen wegen der nicht völlig gleichen Bedingungen sicher keine quantitativen Schlüsse daraus gezogen werden; aber was das grundsätzliche Verhalten der Relationen angeht, dürfte sich ein brauchbares Bild ergeben.) Auch schon *anaerob* bildet sich *pro Mol* verschwundene *Glucose mehr Milchsäure* bei 34° als bei 37°.

Diskussion

Dem eigenartigen Verhalten der Glykolyse mit fallender Temperatur kommt wohl am meisten Bedeutung zu. Es kann nicht durch einen Q_{10} beschrieben werden. Die in einer vorausgehenden Kurzmitteilung[14] ausgesprochene Vermutung hat sich insoweit bestätigt, daß die beiden enzymatischen Hauptwege, der oxydative und der anoxydative, eine verschiedene Temperaturabhängigkeit besitzen. Zu weit ging die Vorstellung, daß die aerobe Glykolyse deshalb erst unterhalb 34° abnehme, weil es in Folge der stärkeren Temperaturabhängigkeit der Atmung über den Pasteureffekt zu einer relativen Steigerung der Glykolyse käme. Es hat sich nunmehr herausgestellt, daß eigenartigerweise bereits die anaerobe Glykolyse durch einen derartigen Verlauf mit fallender Temperatur charakterisiert ist.

Diese ungewöhnliche Temperaturabhängigkeit der Glykolyse dürfte schwer zu erklären sein, da sie möglicherweise eine komplizierte Resultante ist, zusammengesetzt aus mehreren Größen mit verschiedener Temperaturabhängigkeit. Man könnte z. B. daran denken, daß die Substratdiffusion mit steigender Temperatur zum limitierenden Faktor wird, so daß ab 34° aufwärts eine weitere Zunahme der Glykolyserate nicht mehr möglich ist. Die Tatsache, daß unter anaeroben Bedingungen der aktive Glucosetransport durch die Mucosa praktisch stillsteht (siehe nachfolgende Mitteilung), kann hierfür nicht in Anspruch genommen werden, denn die Glucoseabnahme gehorcht unter denselben Bedingungen der RGT-Regel. Die Glucosediffusion zu den Zellen funktioniert also. Das steht nicht in Widerspruch zu der Feststellung, daß der Glucosetransport durch die Mucosa nicht mehr abläuft. Diese spezielle Fähigkeit des Resorptionsorgans, Glucose gleichsam unangetastet durchzuschleusen, muß unterschieden werden von der Versorgung der einzelnen Zellen der Darmwand mit Glucose für den eigenen Bedarf.

Die Frage ist, ob diese am isolierten Gewebe gefundene eigentümliche Temperaturabhängigkeit der Glykolyse (sofern wir die Milchsäurebildung mit Recht als Maß dafür nehmen dürfen) auch in vivo

unter bestimmten Bedingungen gilt. Dieses Verhalten der Glykolyse könnte dann eine Erklärung der Tatsache ermöglichen, daß gerade bei einer Kerntemperatur unter 34° die Temperaturregulation zusammenbricht.

DNP steigert am isolierten Gewebe die Atmung auch noch unterhalb 34° und nahezu im gleichen Ausmaß. Warum versagt dann trotzdem die Regulation der Körpertemperatur unterhalb 34°? Eine rein descriptive Antwort wäre: weil erst von 34° an die Glykolyse mit der Temperatur steil abfällt und zwar steiler als die Atmung. Durch diese besondere Temperaturabhängigkeit der Glykolyse ist aber gleichzeitig der kalorigenen Wirkung von Stoffen, die wie DNP entkoppeln, eine Grenze gesetzt, die bei 34° liegt. — Man ist versucht, Thyroxin hier in Analogie zu stellen, zumal sicher ist, daß die Schilddrüsenaktivität unter Kälteeinfluß sich schon innerhalb kurzer Zeit ändert[2,5] und eine vermehrte Ausschüttung von Thyroxin bei sinkender Temperatur zur Stabilisierung der Körpertemperatur beiträgt[15,18]. Durch neuere Untersuchungen jedoch ist eine Gleichsetzung fraglich geworden*.

Diese am isolierten Gewebe gewonnenen Befunde scheinen — wenn auch nicht ohne Vorbehalt — Rückschlüsse auf die Verhältnisse in vivo zuzulassen. Hall u. Mitarb.[11] fanden nämlich an Katze und Hund tatsächlich, daß die kalorigene Wirkung des DNP mit fallender Temperatur bis in den Bereich zwischen 33 und 35° eine relative Zunahme zeigt und daß gleichzeitig die Milchsäurekonzentration in Blut und Muskel ansteigt. Demnach mag die Annahme, das eigenartige Verhalten der Glykolyse mit sinkender Temperatur sei ein Grund dafür, daß gerade bei 34° die Temperaturregulation versage, einen gewissen Grad von Wahrscheinlichkeit besitzen. Eine dem Zellstoffwechsel inhärente Eigenschaft würde dann mit zu den Voraussetzungen für die Stabilisierung der Körpertemperatur gehören.

Summary

1. Q_{10} of the O_2-consumption of jejunum pieces (guinea pig) is 1,7 under normal conditions as well as after stimulation by 2,4-Dinitrophenol (DNP). The activated respiration is 30% higher.

2. Anaerobically the disappearance of glucose is more reduced by a decrease of temperature from 37° to 34° C than aerobically. Aerobic $Q_{10} = 2{,}0$; anaerobic $Q_{10} = 2{,}7$. In presence of DNP the diminution of glucose disappearance at 34° C is more ecxtensive than it could be expected theoretically.

3. The rate of lactic acid formation especially under anaerobic conditions and in presence of DNP remains virtually the same at 34° as

* Tapley, D. F., a. C. Cooper [J. Biol. Chem. **222**, 341 (1956)] und eigene noch unveröffentliche Befunde.

at 37° C. However, below 34° the glycolysis decreases more than the respiration.

4. The different temperature slope of glycolysis and respiration causes a relative maximum. The value of ratio mol lactic acid to mol glucose or oxygen is higher at 34° than at 37°.

5. The consequence of the different properties of glycolysis and respiration concerning the dependence on temperature is discussed. There might be a relationship between the failure of heat regulation below 34° and these findings. The calorigenic effect of a substance uncoupling like DNP is limited through the fact of the steep fall of glycolytic activity below 34° C.

Literatur

[1] Barker, J. B., and W. H. Summerson: J. of Biol. Chem. **138**, 535 (1941). — [2] Catz, B., Ishan el Rawi and E. Geiger: Amer. J. Physiol. **174**, 29 (1953). — [3] Dill, D. B., and W. H. Forbes: Amer. J. Physiol. **132**, 685 (1941). — [4] Fisher, R. B., and D. S. Parsons: J. of Physiol. **110**, 36 (1949). — [5] Freinkel, N., and D. Lewis: J. of Physiol. **135**, 288 (1957) — [6] Fuhrman, G. J., and J. Field: Federat. Proc. **3**, 1 (1944). — [7] Gänshirt, H., et H. Brilmayer: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 467 (1954). — [8] Gosselin, R. E.: Amer. J. Physiol. **157**, 103 (1949). — [9] Grosse-Brockhoff, F., u. W. Schoedel: Pflügers Arch. **246**, 664 (1943). — [10] Hagedorn, H. C., u. B. N. Jensen: Biochem. Z. **135**, 46 (1923); **137**, 92 (1923). — Nelson, N.: J. of Biol.Chem. **153**, 395 (1944). — King, E. J.: Micro Analysis in Med. Biochem., J. u. A. Churchill Ltd. London (1947). — Frank, H., u. E. Kirberger: Biochem. Z. **320**, 359 (1950). — [11] Hall, V. E., J. Field, M. Sahyun, W. C. Cutting and M. L. Tainter: Amer. J. Physiol. **106**, 432 (1933). — Hall, V. E., J. M. Crismon and P. E. Chamberlain: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **59**, 193 (1937). — [12] Hegnauer, A. H., and H. E. D'amato: Amer. J. Physiol. **178**, 138 (1954). — [13] Hensel, H.: „Mensch und warmblütige Tiere" in „Temperatur und Leben" von H. Precht, J. Christophersen u. H. Hensel, Berlin 1955. — [14] Jacobi, H., u. W. Rummel: Narutwissenschaften **43**, 88 (1956). — [15] Le Blond, C. P., and J. Gross: Endocrinology (Springfield, Ill.) **33**, 155 (1943). — [16] Lutwak-Mann, C., and A. M. Barrett: Biochemic. J. **40**, p. V (1946). — [17] O'Connor, J. M.: Proc. Roy. Irish Acad. **42**, 345, 351 (1935); **43**, 34 (1936); **53**, 33 (1950). — [18] Penrod, K. E.: Amer. J. Physiol. **157**, 436 (1949). — [19] Pichotka, J., B. von Kügelgen u. R. Damann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 398 (1953). — [20] Ring, G. C.: Amer. J. Physiol. **125**, 244 (1939). — [21] Schneider, M.: XXth International Physiological Congress 1956, Abstracts of Reviews p. 98. — [22] Spach, C., M. A. Lucot et Ch. Kayser: C. r. Soc. Biol. (Paris) **149**, 2250 (1955). — [23] Thauer, R.: Erg. Physiol. **41**, 607 (1939). — [24] Werz, R. v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 561 (1943). — [25] Wezler, K., u. R. Thauer: Z. exper. Med. **112**, 345 (1943). — [26] Wilson, T. H.: Biochemic. J. **56**, 521 (1954).

Dr. W. Rummel, Pharmakolog. Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 254—261 (1957)

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)

Zur Wirkung von Butazolidin auf Glutaminsäure-dehydrogenase und α-Ketoglutarat-oxydase

Von
K. H. Bässler und K. Lang

(Eingegangen am 4. Juni 1957)

Über Wirkungen von Butazolidin auf enzymatische Prozesse liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor (Übersicht bei Pulver u. Mitarb.[7]). Zu den ausgeprägtesten Wirkungen zählen die Effekte auf den Cortisonstoffwechsel (Kersten u. Staudinger[5], Korus u. Mitarb.[6]) und auf die α-Ketosäureoxydation (Bässler u. Lang[1], Exer[4]). Von den bisher bekannten Stoffwechselwirkungen steht lediglich die Hemmung des Cortisonabbaus in übersichtlichem Zusammenhang mit der antiphlogistischen Wirkung von Butazolidin.

In vorliegender Arbeit wird über eine Hemmung der Glutaminsäuredehydrogenase berichtet, die bereits bei Butazolidinkonzentrationen von 2,5 mg-% deutlich ist und demnach sicher auch in vivo zur Geltung kommt. Ferner werden in Ergänzung einer früheren Mitteilung Befunde an gereinigter α-Ketoglutarat-oxydase mitgeteilt.

Methodik

Mitochondrien wurden in 0,25 m Rohrzuckerlösung (0,02 m an Trispuffer p_H 7,2) isoliert. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentrationen): KH_2PO_4 0,013 m; Trispuffer 0,029 m; $MgSO_4$ 0,005 m; KCl 0,02 m; ATP 0,0018 m; Cytrochrom c 0,015 μ Mole pro Ansatz. Die Mitochondrien von 10 g Gewebe wurden in 10 ml dieses Mediums suspendiert.

Schweineherzen wurden unmittelbar nach Entnahme aus dem Tier auf dem Schlachthof eisgekühlt. Zur Gewinnung des Homogenats wurde der Herzmuskel von Fett und Bindegewebe befreit, durch einen Fleischwolf getrieben und anschließend im Verhältnis 1:4 mit 0,033 m K-phosphatpuffer p_H 7,2 im Multimix homogenisiert.

Die Vorinkubation von Mitochondrien mit Butazolidin erfolgte 30 min bei 37° unter Schütteln im Wasserbad. Jeweils 4 ml Mitochondriensuspension wurden mit 4 ml 60 mg-%iger Butazolidinlösung bzw. die Kontrollproben mit 4 ml Wasser inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in vorgewärmten Glashomogenisatoren im kochenden Wasserbad 3 min homogenisiert, anschließend rasch abgekühlt und scharf abzentrifugiert. Der leicht opalescente Überstand wurde in Mengen von 1 ml pro Ansatz verwendet.

Die Sauerstoffaufnahme wurde im Warburg-Versuch gemessen. Die einzelnen Ansätze sind jeweils bei den Tabellen angegeben. Die Daten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Kristallisierte Glutaminsäure-dehydrogenase aus Leber wurde von Boehringer/Mannheim bezogen. Die Aktivitätsmessung erfolgte am Photometer Eppendorf bei 366 mμ (Zunahme von DPN-H bei der Dehydrierung von L-Glutamat). Dabei wurde nach dem Vorgehen von BÜCHER[2] die Zeit für eine Extinktionszunahme um 0,1 in Sekunden gestoppt und die Aktivität durch den Quotienten $\frac{100}{\text{gestoppte Sekunden}}$ ausgedrückt. Ansätze bei den Tabellen. Butazolidin der Firma Geigy (Reinsubstanz) wurde in Wasser gelöst und mit NaOH bzw. KOH auf das gewünschte p_H gebracht. Eine Probe des phenolischen Butazolidin-Metaboliten (BURNS[3]), ein p-Hydroxyphenylderivat von Butazolidin, stellte uns freundlicherweise die Firma Dr. Karl Thomae/Biberach zur Verfügung.

α-Ketoglutarat-oxydase wurde nach SANADI u. Mitarb.[8] aus Schweineherz gereinigt. Im Gegensatz zu den Angaben in der Originalvorschrift fiel uns bei der Fällung mit Essigsäure bei p_H 5,4 nur inaktives Protein aus. Wir verwendeten die Fraktion, die zwischen p_H 5,4 und 4,9 ausfiel und erhielten so ein Präparat mit der spez. Aktivität 25 (etwa 30fache Anreicherung über den Rohextrakt). Da in den Versuchen kein Einfluß von Butazolidin, weder im aktivierenden, noch im hemmenden Sinn, zu sehen war, wurde auf weitere Reinigung verzichtet. Im Testsystem von SANADTI[8] mit Ferricyanid als Elektronenacceptor wurde die CO_2-Entwicklung im Warburg-Versuch gemessen.

Ergebnisse

A. Glutaminsäure-dehydrogenase

1. Versuche mit Lebermitochondrien. Aus Tab. 1 ist die Wirkung verschiedener Butazolidinkonzentrationen auf die Oxydation von L-Glutamat durch Rattenlebermitochondrien im Warburg-Versuch ersichtlich.

Tabelle 1. *Oxydation von L-Glutamat durch Lebermitochondrien. Wirkung von Butazolidin (BZD)*

Ansatz: 0,5 ml Mitochondriensuspension (siehe Methodik), 50 μMole L-Glutamat, 200 μMole Semicarbacid (p_H 7,2), Butazolidin in den angegebenen Endkonzentrationen, Wasser ad 2,0 ml; 0,2 ml 2n NaOH im Einsatz. Luft im Gasraum, Temperatur 37°

Vers. Nr.	O_2-Aufnahme (mm³/mg N/Std) (Zahlen in Klammer = % Hemmung)					
	ohne BZD	mit BZD (mg-% Endkonzentration)				
		1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
1	360					25 (93% H.)
2	260					0 (100% H.)
3	220				5 (100% H.)	
4	190	200 (0% H.)	120 (37% H.)	55 (71% H.)		
5	260			74 (72% H.)		11 (96% H.)
6	180	187 (0% H.)	80 (56% H.)	11 (94% H.)		

Bei Butazolidin-Endkonzentrationen von 2,5 mg-% liegen die Hemmungen zwischen 40 und 60%; bei 5 mg-% zwischen 70 und 90% und bei 7,5 mg-% erreichen sie den Wert von 100%.

2. Versuche mit Herzmuskelhomogenat. Im Gegensatz zu den Befunden mit Lebermitochondrien wird die Oxydation von L-Glutamat durch Herzhomogenat selbst bei Butazolidin-Endkonzentrationen von 10 mg-% nicht gehemmt (Tab. 2).

Da die Annahme von Glutaminsäure-dehydrogenasen so verschiedener Eigenschaften in Leber und Herz nicht viel Wahrscheinlichkeit für sich hat, kamen wir zu der Vermutung, daß bei den angewandten Konzentrationen Glutaminsäure-dehydrogenase nicht durch Butazolidin selbst, sondern durch ein Stoffwechselprodukt von Butazolidin gehemmt wird, das zwar in der Leber, nicht aber im Herzmuskel entsteht.

Tabelle 2. *Oxydation von L-Glutamat durch Herzhomogenat. Wirkung von Butazolidin*
Ansatz: 1 ml Herzhomogenat (siehe Methodik), 0,5 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,2, 50 μMole L-Glutamat, Butazolidin in angegebener Endkonzentration, Wasser ad 3,0 ml. 0,2 ml 2n NaOH im Einsatz

mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std	
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD
95	81
45	50
74	77
100	110

Diese Vermutung ließ sich durch folgenden Versuch bestätigen: Wird dem Ansatz mit Herzhomogenat und L-Glutamat Kochsaft von Lebermitochondrien zugesetzt, die mit Butazolidin vorinkubiert worden waren, so wird die Glutamatoxydation gehemmt (Kontrollversuch mit Kochsaft von Lebermitochondrien, die mit Wasser statt Butazolidin vorinkubiert worden waren). Die Ergebnisse gehen aus Tab. 3 hervor. Werden dagegen die Lebermitochondrien vor der

Tabelle 3. *Oxydation von L-Glutamat durch Herzhomogenat. Wirkung von Butazolidin nach Vorinkubation mit Lebermitochondrien*
Ansatz: Wie bei Tab. 2. Dazu 1 ml Extrakt aus Inkubat von Mitochondrien mit BZD bzw. H_2O (siehe Methodik)

mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std		
Zusatz von Extrakt aus Mitochondrien-Inkubat mit H_2O	Zusatz von Extrakt aus Mitochondrien-Inkubat mit BZD	% Hemmung
140	100	30
80	50	38
85	35	60
140	45	70
170	130	25
100	70	30
130	75	42
130	65	50
260	90	65
200	75	62
55	35	36

Inkubation mit Butazolidin aufgekocht, so ist der Extrakt nach der Inkubation mit Butazolidin ohne Wirkung auf die Glutamatoxydation durch Herzmuskelhomogenat.

Bis jetzt wurden keine Versuche unternommen, das Butazolidin-Stoffwechselprodukt zu identifizieren. Es ist aber in diesem Zusammhang

Tabelle 4. *Oxydation von* L-*Glutamat durch Herzhomogenat. Wirkung des phenolischen Butazolidin-Metaboliten*
Ansatz: Wie bei Tab. 2

mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std		% Hemmung
ohne Metabolit	mit Metabolit (6 mg-%)	
86	25	70
102	68	30
120	30	75
160	70	56

interessant, daß der phenolische Butazolidin-Metabolit von BURNS[3] im Herzhomogenat die Glutamatoxydation in gleicher Weise hemmt, wie das nicht identifizierte Stoffwechselprodukt von Butazolidin (Tab. 4).

3. Versuche mit kristallisierter Glutaminsäure-dehydrogenase. Bei kristallisierter Glutaminsäure-dehydrogenase (Leber) liegen die Verhältnisse wie beim Herzmuskelhomogenat. Die Dehydrierung von L-Glutamat durch Glutaminsäure-dehydrogenase wird durch Butazolidin bis zu

Tabelle 5
Wirkung von Butazolidin und Metabolit auf kristallisierte Glutaminsäure-dehydrogenase
Ansatz: 0,2 ml 0,3 m L-Glutamat, 0,15 ml DPN (10 mg/ml), 1,0 ml 0,2 m K-phosphat-Puffer p_H 7,8, 0,5 mg-% Butazolidin bzw. Metabolit wie in der Tabelle angegeben, 0,2 ml verd. Enzym (Enzym mit BZD bzw. Metabolit 5 min vorinkubiert), aq. bidest. ad 3,0 ml. Start mit Glutamat. Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wie unter Methodik angegeben

Aktivität $\left(\frac{100}{\text{sec für } \Delta E = 0{,}1}\right)$				
ohne Zusatz	mit BZD	% Hemmung	mit Metabolit	% Hemmung
6,25	6,25	0	4,55	27
4,15	4,15	0	3,33	20
3,24	3,25	0	2,27	30

Endkonzentrationen von 10 mg-% nicht beeinflußt, dagegen wird sie gehemmt durch 10 mg-% des phenolischen Butazolidin-Metaboliten oder durch Zusatz von Kochsaft aus mit Butazolidin vorinkubierten Lebermitochondrien (Tab. 5 u. 6).

B. α-Ketoglutarat-oxydase

Mit Butazolidinkonzentrationen von 5 mg-%, die gemessen an der Sauerstoffaufnahme im Mitochondriensystem keine Hemmung, sondern

eine Aktivierung verursachen, fanden wir im gereinigten Oxydasesystem keine Aktivierung. Ferner fanden wir im gereinigten System mit Butazolidinkonzentrationen von 10 mg-% keine Hemmung (Tab. 7).

Die Ergebnisse sind dieselben, wenn Butazolidin nicht erst bei Beginn des Versuches dem Ansatz zugesetzt wird, sondern vorher 30 min mit der Fermentlösung präinkubiert wird.

Tabelle 6. *Wirkung von Butazolidin nach Präinkubation mit Mitochondrien auf kristallisierte Glutaminsäure-dehydrogenase*

Ansatz: Wie Tab. 5. 0,2 ml Enzym präinkubiert mit 1 ml Mitochondrienextrakt. (Präinkubation der Mitochondrien und Darstellung des Extrakts siehe Methodik)

Aktivität $\left(\frac{100}{\text{sec für } \Delta E = 0{,}1}\right)$		
mit Extrakt aus Mitochondrien nach Präinkubation mit H_2O	mit Extrakt aus Mitochondrien nach Präinkubation mit BZD	% Hemmung
6,25	5,00	20
7,15	3,57	50
6,25	2,95	53
6,25	3,33	47

Tabelle 7. *Einfluß von Butazolidin (BZD) auf α-Ketoglutarat-oxydase*

Ansatz: 0,5 ml Enzymlösung (siehe Methodik), 30 mg Rinderserumalbumin, 0,3 ml 0,167 m α-Ketoglutarat (mit Ausnahme der Leerwerte), 0,4 ml 1 m $NaHCO_3$, 0,2 ml 0,1 m $MgSO_4$, 220 γ Diphosphothiamin, 0,5 ml 0,1 m K-ferricyanid, BZD wie angegeben, Wasser ad 3,0 ml. Nach 10 min Durchströmen mit CO_2 wird Ferricyanid aus dem Anhang eingekippt und die CO_2-Entwicklung 30 min lang verfolgt

mm^3 CO_2-Entwicklung in 30 min		
ohne BZD	mit 5 mg-% BZD	mit 10 mg-% BZD
330	305	
350	320	
290	280	
340		350
215		205
300		290

Bei der Untersuchung, auf welcher Stufe der Reinigung sich dieser von früheren Befunden an Leber- und Nierenmitochondrien (Bässler u. Lang[1]) abweichende Befund einstellt, fand sich, daß Butazolidin bereits im rohen Homogenat von Herzmuskel, gemessen an der Sauerstoffaufnahme, keine Hemmung der α-Ketoglutaratoxydation verursacht (Tab. 8), sondern im Gegenteil eine Aktivierung.

Bei der Glutaminsäure-dehydrogenase konnten wir nachweisen, daß ein Stoffwechselprodukt von Butazolidin der wirksame Hemmstoff ist (s. oben). Entsprechende Versuche im α-Ketoglutarat-oxydasesystem (Zusatz von Extrakt aus Präinkubat von Lebermitochondrien mit Butazolidin)

waren erfolglos. Das könnte daran liegen, daß zur Hemmung der α-Ketoglutarat-oxydase höhere Hemmstoffkonzentrationen erforderlich sind, die auf diese Weise nicht erreicht werden können. Ein weiterer Unterschied zeigt sich aber darin, daß der phenolische Butazolidin-Metabolit im gereinigten α-Ketoglutarat-oxydasesystem unwirksam ist, im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Glutaminsäure-dehydrogenase (Tab. 9 u. 10).

Tabelle 8. *Einfluß von Butazolidin auf α-Ketoglutaratoxydation in Herzmuskelhomogenat*
Ansatz: 0,5 ml Homogenat (s. Methodik), 50 μMole α-Ketoglutarat (außer in Leerwerten), 0,2 ml 0,1 m $MgSO_4$, 0,5 ml 0,03 m Phosphatpuffer p_H 6,8, Wasser ad 3,0 ml. 0,2 ml 2n NaOH im Einsatz

mm^3 O_2-Verbrauch in 60 min	
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD
130	180
70	120
170	220

Tabelle 9. *Einfluß des phenolischen Butazolidin-Metaboliten auf die α-Ketoglutaratoxydation in Herzmuskelhomogenat*
Ansatz: Wie Tab. 8

mm^3 O_2-Verbrauch in 60 min	
ohne Metabolit	mit 10 mg-% Metabolit
370	420
332	323
125	126

Tabelle 10. *Einfluß des phenolischen Butazolidin-Metaboliten auf die α-Ketoglutarat-oxydation im gereinigten Oxydasesystem*
Ansatz: Wie Tab. 7

mm^3 CO_2-Entwicklung in 30 min		
ohne Metabolit	mit 5 mg-%	mit 10 mg-%
280	280	270
215	—	205

Diskussion

A. Glutaminsäure-dehydrogenase

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Glutaminsäure-dehydrogenase nicht durch Butazolidin selbst, sondern durch ein noch nicht identifiziertes Stoffwechselprodukt gehemmt wird (jedenfalls bei den angewandten Butazolidinkonzentrationen). Da der phenolische Butazolidin-Metabolit die gleiche Wirkung hat, wie das nicht identifizierte Produkt, ist es nicht ausgeschlossen, daß es sich dabei um diese Substanz handelt.

Wallenfels[9] berichtet über eine Hemmung von Glutaminsäure-dehydrogenase durch Butazolidin als Folge einer Komplexbildung mit dem Zink des Enzyms. Er verwandte dabei Butazolidin-Endkonzentrationen von 50 mg-%, 100 mg-% und höher.

Bei unseren geringeren Butazolidinkonzentrationen (10 mg-% und weniger) können wir diese Befunde nicht bestätigen. Derart hohe Butazolidinkonzentrationen in den Zellen nach therapeutischer Gabe sind ausgeschlossen. Nach bisher vorliegenden Konzentrationsbestimmungen (Pulver u. a.[7]) sind Butazolidinkonzentrationen über 2,5 mg-% in Geweben selten und über 10 mg-% so gut wie nie zu erwarten.

Die vorliegenden Befunde zeigen, wie sehr für die Beurteilung der Wirkung eines Pharmakon im Intermediärstoffwechsel die Kenntnis seines eigenen Schicksals im Stoffwechsel entscheidend sein kann. Aus diesem Grunde können Untersuchungen über die Wirkung auf isolierte Enzyme kein vollständiges Bild geben.

B. α-Ketoglutarat-oxydase

Da eine Hemmwirkung von Butazolidin im α-Ketoglutarat-oxydasesystem erst bei relativ hohen Butazolidinkonzentrationen (10 mg-%) deutlich ist, wurde in letzter Zeit mehr die aktivierende Wirkung geringerer Konzentrationen (2,5—5 mg-%) in den Vordergrund gerückt, mit dem Hinweis auf den Energiebedarf für den Heilungsvorgang entzündlicher Prozesse (Pulver[7]). Da geringe Butazolidinkonzentrationen nach unseren Befunden im gereinigten α-Ketoglutarat-oxydasesystem unter vom Elektronentransportsystem unabhängigen Testbedingungen keine Aktivierung hervorrufen, muß man annehmen, daß die Aktivierung in Mitochondriensystemen durch Entkoppelung von Oxydation und Phosphorylierung zustande kommt und somit nicht mit vermehrter Energielieferung verbunden ist. Bei höheren Butazolidinkonzentrationen (10 mg-%) wird im Mitochondriensystem durch die Hemmung im primären Oxydasesystem die Entkoppelung unwirksam.

Die Art und Weise, in der Butazolidin die α-Ketoglutaratoxydation in Lebermitochondrien hemmt, ist noch völlig ungeklärt, da es im gereinigten System wirkungslos ist und da es bisher noch nicht gelungen ist, wie bei der Glutaminsäure-dehydrogenase ein Butazolidin-Stoffwechselprodukt als wirksamen Faktor nachzuweisen.

Summary

Glutamic dehydrogenase of rat liver mitochondria is inhibited by phenylbutazone at a final concentration of 2,5 mg-% ($0{,}81 \cdot 10^{-4}$ M). However, glutamic dehydrogenase in heart muscle homogenate and the cristalline enzyme from liver are not inhibited by phenylbutazone up to 10 mg-% ($3{,}24 \cdot 10^{-4}$ M), but they are inhibited by a metabolite arising during incubation of liver mitochondria with phenylbutazone.

A p-hydroxyphenil derivative of phenylbutazone also inhibits glutamie dehydrogenase from heart muscle homogenate and the cristalline enzyme.

Phenylbutazone does not act on the purified α-ketoglutaric oxydase system although α-ketoglutaric oxydation by intact rat liver mitochondria is inhibited. The reason for this discrepancy remains open.

Für Unterstützung der Arbeit danken wir der Firma Dr. Karl Thomae/Biberach. Für Gaben von ATP danken wir dem Zellstoffwerk Waldhof, für Cytochrom c Herrn Dr. Forster, Firma Mack/Illertissen.

Literatur

[1] Bässler, K. H., u. K. Lang: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 568 (1956). — [2] Beisenherz, G., H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer: Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953). — [3] Burns, J. J., R. K. Rose, S. Goodwin, J. Reichenthal, E. C. Horning and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **113**, 481 (1955). — [4] Exer, B.: Experientia (Basel) **12**, 294 (1956). — [5] Kersten, H., u. Hj. Staudinger: Klin. Wschr. **1956**, 523. — [6] Korus, W., H. Schriefers u. W. Dirscherl: Arzneimittel-Forsch. **6**, 596 (1956). — [7] Pulver, R., B. Exer u. B. Herrmann: Schweiz. med. Wschr. **1956**, 1080. — [8] Sanadi, D. R., J. W. Littlefield and R. M. Bock: J. of Biol. Chem. **197**, 851 (1952). — [9] Wallenfels, K., H. Sund u. K. Diekmann: Biochem. Z. **329**, 48 (1957).

Professor Dr. Dr. K. Lang und Priv.-Doz. Dr. med. K. H. Bässler, Mainz, Physiologisch-chemisches Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 262—266 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser)

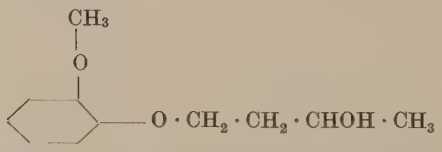
Die choleretische Wirkung eines Guajakol-Butandioläthers

Von
Gerhard Bornmann

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Mai 1957)

Frühere Versuche (1, 2) hatten ergeben, daß verschiedene aliphatische Substitutionsprodukte des zweiwertigen Alkohols 1,3-Butandiol choleretisch wirken. Es schien daher naheliegend und von Interesse, zu prüfen, ob nicht auch unter den aromatischen Abkömmlingen vom 1,3-Butandiol gallewirksame Substanzen zu finden wären. Aus diesem Grund wurden in den Kreis von Untersuchungen, in denen zunächst einige der chemischen Konstitution der Verbindungen nach zu erwartende Wirkungen geprüft worden waren, auch Galleversuche einbezogen. Dabei hatte sich gezeigt, daß manche aromatische Butandioläther muskelrelaxierend wirken (Methode nach Goodsell u. Mitarb.), die Körpertemperatur senken und — in hoher Konzentration — auch die Motorik glattmuskulärer Organe hemmen können, einen nur geringen Einfluß auf den Blutdruck haben und weder eine krampfhemmende noch -fördernde Wirkung besitzen (Kombinationsversuche mit Cardiazol), den Gallefluß aber tatsächlich recht kräftig steigern.



Neben Versuchen zur Ermittlung der allgemeinen Toxicität wurde daher eingehend die choleretische Wirkung des Guajakol-1,3-Butandioläthers 1-(2'-Methoxyphenoxy)-3-oxybutan* im Vergleich zu dem bekannten galletreibenden Natriumdehydrocholat** geprüft. Dem untersuchten Butandioläther kommt die Summenformel $C_{11}H_{16}O_3$ zu, er ist in reinem Zustand ein weißes, geruchloses Pulver, für das folgende Konstanten angegeben werden: FP 49—50° C; Kp_{14} 167—168° C.

* Farbwerke Hoechst A. G.
** „Decholin", Riedel-de Haën A.G.

Methodisches

Die Toxicitätsbestimmung — 200 Mäuse, 120 Ratten — wurde in üblicher Weise nach Kärber, die Berechnung der mittleren tödlichen Dosis (LD 50) in der von Burn angegebenen Weise vorgenommen.

Die Cholerese-Versuche wurden als akute Versuche am narkotisierten Tier (Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund) ausgeführt; Narkoticum: Äthylurethan 1,2 g/kg s. c., im Bedarfsfall noch ein- oder mehrmals 0,2—0,3 g/kg. In allen Versuchen wurde die Gallenflüssigkeit durch eine Sonde, die in den Ductus choledochus eingelegt war, nach außen abgeleitet und die Tropfenzahl elektrisch registriert. Bei Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden war die Gallenblase abgebunden, die abgeflossene Galle wurde hier in Abständen von 10—20 min intraduodenal reinjiziert.

Die Zufuhr der Prüfsubstanzen erfolgte bei Ratten durch eine Schlundsonde in den Magen oder intramuskulär, bei Meerschweinchen und Kaninchen parenteral oder durch eine in das Duodenum eingeführte Sonde intraduodenal, bei Hunden subcutan oder intravenös.

Der in Wasser wenig lösliche Guajakol-1,3-Butandioläther wurde meist als 5%ige Suspension (Aqua dest.), Natriumdehydrocholat in Form des Handelspräparates Decholin (20%iges dehydrocholsaures Natrium) evtl. nach Verdünnung mit Aqua dest. verwendet.

Ergebnisse

Toxicität. Das Vergiftungsbild nach Zufuhr steigender Mengen vom Guajakol-1,3-Butandioläther ist bei *Mäusen* wenig eindrucksvoll und im ganzen ähnlich wie nach Natriumdehydrocholat; wenn sich eine deutliche Wirkung außer einer gewissen Stumpfheit und Bewegungsarmut der Tiere zeigt, dann als Benommenheit bis zur Bewußtlosigkeit, evtl. mit Seitenlage. Nach einer Phase krampfhafter Atmung tritt evtl. der Exitus offenbar infolge zentraler Lähmung ein. Nur gelegentlich wird kurz ante exitum bei den Mäusen, die den Guajakol-1,3-Butandioläther erhalten hatten, ein allgemeines Muskelzittern beobachtet. Innerhalb 24 Std ist für Versuchs- wie Vergleichssubstanz die Entscheidung über den weiteren Ablauf der Vergiftung gefallen.

Die LD 50 (24 Std) nach oraler Zufuhr (20 %ige *Suspension* in Aqua dest.) betrug für den Guajakol-1,3-Butandioläther bei Mäusen 10,7 cm^3/kg; dabei wirkten 6,0 cm^3/kg nie, 8,0 cm^3/kg bei 3 von 10 Tieren, 16,0 cm^3/kg bei 10 von 10 Mäusen tödlich. Zum Vergleich seien die entsprechenden Werte für die Vergleichssubstanz Natriumdehydrocholat (20 %ige Handels*lösung*, unverdünnt) genannt: LD 50 (24 Std, per os) 20,3 cm^3/kg; dabei wirkten 12,0 cm^3/kg nie, 14,0 cm^3/kg bei 2 von 10 Tieren, 30,0 cm^3/kg bei 10 von 10 Tieren tödlich. Ein ähnliches Wirkungsverhältnis ergab sich auch bei Prüfung der subcutanen Toxicität; in diesen Versuchen wurde eine 5%ige wäßrige Suspension des Guajakol-1,3-Butandioläthers bzw. eine 5%ige Lösung von Natriumdehydrocholat (d. h. die Handelsware 1 : 4 mit Aqua dest. verdünnt) gebraucht. Die LD 50 (24 Std) betrug für die Suspension der Versuchssubstanz 19,25 cm^3/kg, für die Vergleichslösung 37,0 cm^3/kg.

Bei Mäusen war also der Guajakol-1,3-Butandiolaether annähernd doppelt so toxisch wie die Vergleichssubstanz, dehydrocholsaures Natrium.

Ein anderes Ergebnis hatten die Versuche bei *Ratten*. Unter Berücksichtigung der Mäuse-Versuche wurde hier eine 10%ige Suspension von dem Guajakol-1,3-Butandiolaether mit einer 20%igen Lösung des dehydrocholsauren Natriums, d. h. der unverdünnten Handelslösung verglichen. Die Vergiftungsbilder unterschieden sich deutlich. Nach oraler Zufuhr vom Guajakol-1,3-Butandioläther waren die Ratten zunächst torkelig, benommen evtl. bewußtlos und nahmen Bauch- oder Seitenlage ein (nicht erweckbar). Entweder verlief die Vergiftung in diesem Stadium tödlich, oder es kam zur Erholung, die aber nach Verabreichung größerer Mengen der Prüfsubstanz oft nicht lange anhielt. Es traten blutig verfärbte Durchfälle auf, bei denen die Ratten zunächst noch munter bleiben konnten, und erst jetzt entschied sich endgültig, ob die Vergiftung überstanden wurde oder über zunehmende Verelendung mit Muskelzittern, gelegentlich auch Krämpfen, tödlich endete. Nach Natriumdehydrocholat wurden die Ratten bald stumpf und träge, „brüteten" dumpf vor sich hin, waren aber jederzeit erweckbar. Meist trat völlige Erholung ein, sonst gingen die Tiere in zunehmender Narkose oder nach kurzfristiger Verelendung — oft mit nicht sehr starkem Durchfall — zugrunde. In jedem Fall mußte die Beobachtungszeit bei Ratten auf 7 Tage ausgedehnt werden, denn bei beiden Substanzen war der Ablauf der Vergiftung nicht innerhalb 24 Std entschieden.

Eine LD 50 wurde bei der Ratte nicht ermittelt, sondern nur die Grenze „beginnende letale Wirkung" bei einer Beobachtungszeit von insgesamt 7 Tagen festgelegt; sie ist anzusetzen für den Guajakol-1,3-Butandioläther zwischen 8,0 cm^3/kg (keine von 10 Ratten †) und 11 cm^3/kg (4 von 10 Ratten †), für das Natriumdehydrocholat zwischen 11,0 cm^3/kg (keine von 10 Ratten †) und 14,0 cm^3/kg (2 von 5 Ratten †). Bei weiterer Steigerung der Mengen bestand trotz der Tatsache, daß bereits unterschiedliche Konzentrationen in diesen Versuchen gebraucht wurden, für die gewählten Zubereitungen nochmals ein Wirkungsverhältnis von etwa 2 : 1. Mit anderen Worten, bei der Ratte ist der Guajakol-1,3-Butandioläther rund 4 mal so toxisch wie das dehydrocholsaure Natrium. Diese Feststellung war Richtschnur bei den nachstehenden Galleversuchen: es wurde grundsätzlich das Natriumdehydrocholat in vierfach höherer Konzentration bzw. in vierfach größerer Menge angewandt als der Guajakol-1,3-Butandioläther. Damit betraf der Vergleich jeweils Mengen beider Substanzen, die nach den Rattenversuchen als isotoxisch angesehen werden dürfen.

Gallewirkung. Der Guajakol-1,3-Butandioläther (5%ige Suspension) steigert, mit der Magensonde verabreicht, bei Ratten in der ersten

Halbstunde nach der Zufuhr den Gallefluß etwa so stark wie die handelsübliche 20%ige Lösung von Natriumdehydrocholat, in den nächsten Halbstunden aber deutlich stärker. Das gilt sowohl für die niedrige als auch für die hohe geprüfte Dosis — 2,0 cm³/kg (Abb. 1a) bzw. 5,0 cm³/kg Körpergewicht (Abb. 1b) — und geht besonders deutlich aus einigen Versuchen hervor, die über 6 Std ausgedehnt wurden (Abb. 2). Die

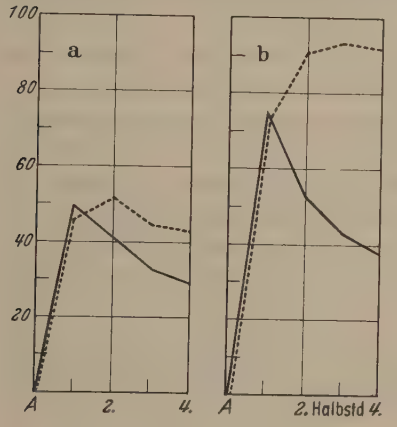


Abb. 1

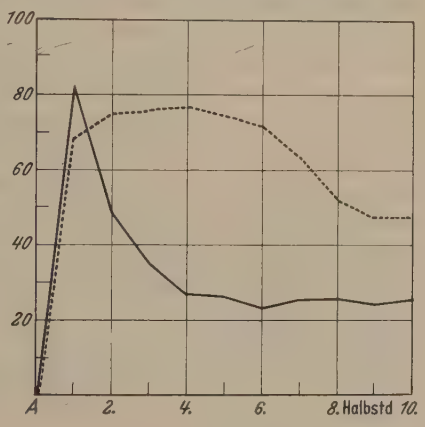


Abb. 2

Abb. 1. Steigerung des Galleflusses von Ratten nach oraler Zufuhr (Schlundsonde) von Guajakol-1,3-Butandioläther (5%ige wäßrige Suspension, ...) oder — zum Vergleich — von dehydrocholsaurem Natrium (20%ige Lösung, ———) in Prozent des Ausgangswertes. Fig. a: 2,0 cm³/kg Körpergewicht; Fig. b: 5,0 cm³/kg Körpergewicht. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert aus 6 Versuchen. Ordinate: Prozent des Ausgangswertes. Abszisse: Halbstunden nach Zufuhr der Prüfsubstanz. *A* Ausgangswert (eine Halbstunde vor Zufuhr der Prüfsubstanz)

Abb. 2. Steigerung des Galleflusses von Ratten nach oraler Zufuhr (Schlundsonde) von Guajakol-1,3-Butandioläther (5,0 cm³ der 5%igen wäßrigen Suspension je kg K.-gew., ...) oder — zum Vergleich — von dehydrocholsaurem Natrium (5,0 cm³ der 20%igen Lösung je kg K.-gew., ———) in Prozent des Ausgangswertes. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert aus 3 Versuchen. Ordinate: Prozent des Ausgangswertes. Abszisse: Halbstunden nach Zufuhr der Prüfsubstanz. *A* Ausgangswert (eine Halbstunde vor Zufuhr der Prüfsubstanz)

choleretische Wirkung des Butandioläthers tritt zuverlässig ein, wenn auch in der Stärke des Effektes von Tier zu Tier, ähnlich wie nach Natriumdehydrocholat, nicht unerhebliche Unterschiede bestehen.

Auch nach intramuskulärer Injektion wirkt der Guajakol-1,3-Butandioläther deutlich galletreibend, ähnlich wie die Vergleichssubstanz; auf einen genauen Wirkungsvergleich wurde verzichtet, da der Butandioläther nicht als Lösung, sondern als Suspension vorlag, und somit die Resorptionsbedingungen schlecht übersehbar sind.

Über die Qualität der unter dem Einfluß des oral zugeführten Guajakol-1,3-Butandioläthers abgesonderten Galle kann auf Grund von Bestimmungen des Trockengehaltes gesagt werden, daß der Trockengehalt abnimmt gegenüber dem Ausgangswert. Mit zunehmender Versuchsdauer wird das Absinken des Trockengehaltes immer stärker. Eine

derartige Abnahme des Trockengehaltes ist auch nach Zufuhr von Natriumdehydrocholat festzustellen, allerdings in den ersten Halbstunden nach Verabfolgung des gallensauren Salzes weniger ausgesprochen. Bei Kontrolltieren, die physiologische Kochsalzlösung erhielten, tritt ebenfalls, wenn auch nur allmählich und in geringem Maß, mit zunehmender Versuchsdauer eine Abnahme des Trockengehaltes der Galle ein. Offenbar spielt die Ableitung der Gallenflüssigkeit nach außen und damit der Verlust an Trockensubstanz eine Rolle; je stärker der Gallefluß ist, um so größer ist der Verlust an Trockensubstanz. Soweit das Choleretikum selbst nicht durch die Galle ausgeschieden und als „Trockensubstanz" mitbestimmt wird, ist dementsprechend nach Verabfolgung von einem Choleretikum mit einer drastischen Abnahme des Trockengehalts zu rechnen. Die Ermittlung der je Zeiteinheit abgegebenen Menge an Trockensubstanz bei den mit Butandioläther behandelten Ratten zeigt übrigens, daß bei erheblicher Steigerung des Galleflusses die Gesamtmenge an ausgeschiedener Trockensubstanz größer als vor Verabfolgung der Prüfsubstanz ist.

Der Guajakol-1,3-Butandioläther fördert auch bei Meerschweinchen die Absonderung von Gallenflüssigkeit. Nach intraduodenaler Applikation ist die Wirkung zuverlässiger und deutlicher als nach parenteraler Verabfolgung.

Subcutan oder intravenös verabfolgt steigert der Butandioläther den Gallefluß des Hundes (zwei Versuche) recht deutlich, nach intravenöser Injektion von 3,5 cm^3/kg K.-gew. einer 1%igen Lösung z. B. auf das 5fache.

Bei Kaninchen ist die Wirkung des Guajakol-1,3-Butandioläthers nur schwach und unsicher, jedenfalls sind nach intravenöser Injektion 5,0 cm^3/kg K.-gew. einer 1%igen Lösung sehr viel weniger wirksam als 1,0 cm^3/kg K.-gew. der 20%igen Lösung des dehydrocholsauren Natriums, und auch bei intraduodenaler Applikation fällt ein Wirkungsvergleich zugunsten des gallensauren Salzes aus. Immerhin ist aber festzustellen, daß im Gegensatz zu den früher geprüften aliphatischen Butandioläthern der jetzt untersuchte aromatische Äther eine gewisse Wirkung auch beim Kaninchen zeigen kann.

Zusammenfassung

Frühere Versuche mit aliphatischen Äthern fortführend wurden aromatische Äther von 1,3-Butandiol untersucht und choleretische Wirkungen bei verschiedenen Tierarten für den Guajakol-1,3-Butandioläther nachgewiesen.

Literatur

Bornmann, G.: (1) Arzneimittelforschung **2**, 122 (1952). — (2) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 367 (1956). — Goodsell, J. S., J. E. P. Toman, G. M. Everett and R. K. Richards: J. Pharmacol. exper. Ther. **110**, 251 (1954).

Dr. Gerhard Bornmann, Pharmakolog. Inst d. Univ. Münster/Westf.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 267—278 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Pharmakologische Beeinflussung der Frequenz der Hippocampustätigkeit während retikulärer Reizung

Von
F. Brücke, S. Sailer und Ch. Stumpf

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Juni 1957)

Die bioelektrische Tätigkeit des Rhinencephalon zeigt während einer „arousal reaction" (AR) keine Desynchronisierung wie etwa der Neocortex und insbesondere der präzentrale Cortex, sondern eine langsame, regelmäßige und hohe Tätigkeit. Diese Tätigkeit wurde erstmalig von Jung u. Kornmüller beschrieben und später von Green u. Arduini eingehend untersucht. Kürzlich haben Sailer u. Stumpf (1957a) die Frequenz dieser regelmäßigen rhinencephalen Tätigkeit unter verschiedenen Versuchsbedingungen einer genaueren Analyse unterzogen.

Hierbei zeigte es sich, daß diese Frequenz noch während des auslösenden Reizes in annähernd exponentieller Weise absinkt. Bei Reizung des ascendierenden retikulären Systems und bei peripherer Reizung der Extremitätenmuskulatur besteht zwischen der initialen Frequenz der Hippocampustätigkeit und der Intensität des Reizes eine signifikante positive Korrelation. Substanzen, die das ascendierende retikuläre System erregen (Physostigmin), verändern nicht nur die Tätigkeit des Neocortex, sondern auch die des Hippocampus in gleicher Weise wie eine elektrische Reizung dieses Systems. Auch in diesem Fall ließ sich zwischen der Höhe der Physostigmin-Dosis und der Frequenz der Hippocampustätigkeit eine positive Korrelation nachweisen.

Von einer großen Anzahl von Substanzen ist bekannt, daß sie die auf verschiedene Weise ausgelöste AR zu blockieren imstande sind. Uns interessierte nun die Frage, auf welche Weise die rhinencephale AR durch solche Substanzen beeinflußt wird. Nachdem es sich bei den erwähnten Untersuchungen (Sailer u. Stumpf 1957a) gezeigt hatte, daß sich cortical desynchronisierend wirkende Pharmaka bezüglich ihrer Wirkung auf die rhinencephale Tätigkeit des Kaninchens zum Teil erheblich unterscheiden, schien es uns denkbar, daß eine ähnliche Differenzierung auch bei der Gruppe von Substanzen durchgeführt werden kann, die die AR blockieren. Die zu diesem Zweck in die vorliegenden Untersuchungen einbezogenen Substanzen waren: ein Barbiturat (Evipan), einige Lokalanaesthetica (insbesondere Procain), ferner Largactil und Scopolamin. Von den genannten Pharmaka (mit Ausnahme der Lokalanaesthetica)

ist bekannt, daß ihnen als gemeinsame Eigenschaft eine blockierende Wirkung auf die AR eigen ist, sie sich aber in anderer Hinsicht, so z. B. bezüglich ihrer Wirkung auf das Verhalten der Tiere, wesentlich voneinander unterscheiden. Die Parasympathicolytica Atropin und Scopolamin üben in Dosen, die die AR aufheben, praktisch keinen Einfluß auf das Verhalten der Tiere aus (Bradley u. Elkes 1953, 1957; Funderburk u. Case; Longo 1956; Rinaldi u. Himwich 1955a); Wikler hat erstmalig auf diese Dissoziation zwischen EEG und Verhalten unter dem Einfluß von Atropin hingewiesen. Andererseits wird die hypnotische bzw. narkotische Wirkung der Barbiturate (Arduini u. Arduini; French et al.; King), sowie die beruhigende Wirkung des Largactil (Hiebel et al.; Terzian) gerade damit erklärt, daß diese Substanzen die Funktion des aszendierenden retikulären Systems hemmen. Ebenso unterscheiden sich Parasympathicolytica, Barbiturate und Largactil bezüglich der antagonistischen Beeinflußbarkeit durch verschiedene cortical desynchronisierend wirkende Substanzen (Bradley; Brádley u. Hance; Bradley u. Elkes 1957).

Methodik

Die Versuche wurden an 26 wachen, nicht curarisierten Kaninchen im Gewicht zwischen 2,0 und 2,5 kg durchgeführt. Das Elektroencephalogramm wurde nach der stereotaktischen Methode von Monnier u. Laue stets bipolar abgeleitet und mit Hilfe eines Schwarzer-Elektroencephalographen, Type E 502, registriert. Die Zeitkonstante betrug 0,1 sec. Abgeleitet wurde einerseits vom Cortex, und zwar von der Area praecentralis granularis, parietalis und striata (Nomenklatur nach Rose) der linken Hemisphäre und andererseits vom dorsalen Rhinencephalon (Hippocampus) der rechten Hemishpäre. Die genaue Lokalisation der Elektroden sowie weitere Einzelheiten sind in unserer früheren Arbeit (Sailer u. Stumpf 1957a) ausführlich beschrieben.

Zur Auslösung einer AR wurde das ascendierende retikuläre System in der Höhe der vorderen Vierhügel mit Hilfe eines Grass-Stimulators, Modell S 4A, unter Zwischenschaltung einer Stimulus Isolation Unit, Modell SIU 4A, elektrisch gereizt. Die einzelnen Impulsserien hatten eine Dauer von je 5 sec; die Dauer der Einzelimpulse betrug 1,5 msec und die Frequenz 250 Hz. Die Spannung wurde so gewählt, daß die initiale (d. h. die innerhalb der ersten 2 sec nach Reizbeginn vorliegende) Frequenz der Hippocampustätigkeit 6,5—7,5 Hz betrug; erfahrungsgemäß sind zur Erzielung einer solchen Frequenz Spannungen notwendig, die etwa 2—3mal größer sind als die Schwellenspannung. Bezüglich der genauen Lokalisation der Reizelektroden siehe Sailer u. Stumpf (1957a).

Es wurde die Beeinflussung der rhinencephalen AR durch folgende Substanzen untersucht: N-Methyl-cyclohexenyl-methylbarbitursaures Natrium (Evipan-Natrium, Bayer; 10%ig, 10 mg/kg), p-Aminobenzoyl-diäthyl-aminoäthanol-hydrochlorid (Procain, Merck; 2%ig, 10 mg/kg), N-(3′-Dimethylaminopropyl)-3-chlorphenothiazin (Largactil, Specia; 1%ig, 10 mg/kg), Scopolaminum hydrobromicum (0,1%ig, 1 mg/kg). Orientierend untersucht wurden ferner: Cocainum hydrochloricum (2%ig, 5 mg/kg) und p-Butyl-aminobenzoyldimethylaminoäthanol-hydrochlorid (Pantocain, Höchst; 1%ig, 2 mg/kg).

Zu Beginn jedes Versuches wurde zunächst jene Reizspannung ermittelt, die im Hippocampus die gewünschte initiale Frequenz von 6,5—7,5 Hz verursachte.

Mit dieser Spannung wurden dann in Abständen von je 5 min Reizungen vorgenommen, und zwar so lange, bis mindestens 4 aufeinanderfolgende Reizungen die gleiche initiale Hippocampusfrequenz bewirkten. Erst dann wurde eine der genannten Substanzen intravenös injiziert und neuerlich in Abständen von mindestens 5 min Reizungen vorgenommen. Die Substanzen wurden im allgemeinen in den oben angegebenen Dosierungen verabreicht; zur Bestimmung der Abhängigkeit des Effektes von der Dosierung wurden jedoch in einigen Versuchen auch höhere bzw. niedrigere Dosen appliziert.

Bei allen Versuchen wurde die Frequenz der Hippocampustätigkeit in der Weise ermittelt, daß die Anzahl der regelmäßigen Potentialschwankungen vom Reizbeginn angefangen in mehreren aufeinanderfolgenden 2 sec-Perioden ausgezählt wurde. Unter „initialer Frequenz" der Hippocampustätigkeit ist in dieser Arbeit immer jene Frequenz zu verstehen, die während der ersten beiden Sekunden nach Beginn der reticulären Reizung im Hippocampus zu verzeichnen war.

Ergebnisse

Bei den meisten Versuchen lieferten bereits die ersten vier, in Abständen von je 5 min durchgeführten retikulären Reizungen konstante initiale Frequenzen der Hippocampustätigkeit. In einigen Versuchen lösten die ersten zwei bis drei Reizungen variable Reaktionen im Hippocampus aus; jedoch konnten auch hier durch die nachfolgenden Reizungen konstante Hippocampusreaktionen erzielt werden. Bei jeder Reizung sank die initiale Hippocampusfrequenz noch während des Reizes ab und ging am Ende der Reaktion, sobald sie eine Frequenz von etwa 4,5 Hz erreicht hatte, in die unregelmäßige Hippocampus-Ruhetätigkeit über. Die corticale AR, charakterisiert durch eine Verflachung des ECG, überdauerte das Ende des retikulären Reizes, in gleicher Weise wie die rhinencephale AR, meist um mehrere Sekunden. Im allgemeinen dauerte die corticale AR etwas länger (1—2 sec länger) als die rhinencephale.

Wirkungen der einzelnen Substanzen

1. Procain. Unmittelbar nach der i. v. Injektion von 10 mg/kg Procain kam es in einigen Versuchen cortical zu einer Verflachung der Kurven und im Hippocampus zu einer Regularisierung und Rhythmisierung der Tätigkeit. Wenn ein solcher Effekt vorhanden war, dauerte er jedoch höchstens 1—2 min an.

Kurze Zeit (etwa 1—5 min) nach der Injektion war die Dauer der corticalen und rhinencephalen AR bei retikulärer Reizung erheblich verkürzt; während jedoch die corticale AR zu diesem Zeitpunkt oft völlig aufgehoben war, zeigte die rhinencephale AR gleichzeitig meist nur eine Verkürzung auf die Dauer des Reizes, d. h. auf annähernd 5 sec. Parallel mit der Verkürzung der Dauer dieser Reaktion war immer eine erhebliche Verlangsamung der initialen Frequenz von durchschnittlich 7 Hz vor der Behandlung auf etwa 5—5,5 Hz zu beobachten. Innerhalb eines Zeitraumes von etwa 5—20 min nach der Injektion trat eine allmähliche Normalisierung der Reaktion auf retikuläre Reizung in Erscheinung: die

Dauer sowohl der corticalen als auch der rhinencephalen AR nahm wieder zu und parallel damit stieg auch die initiale Hippocampusfrequenz wieder auf den Ausgangswert an. Diese Verhältnisse sind in Abb. 1A und 2A wiedergegeben. Wie aus Abb. 1A hervorgeht, reagierten die vier Tiere, insbesondere bezüglich der Veränderungen der initialen Hippocampusfrequenz bei retikulärer Reizung, weitgehend einheitlich.

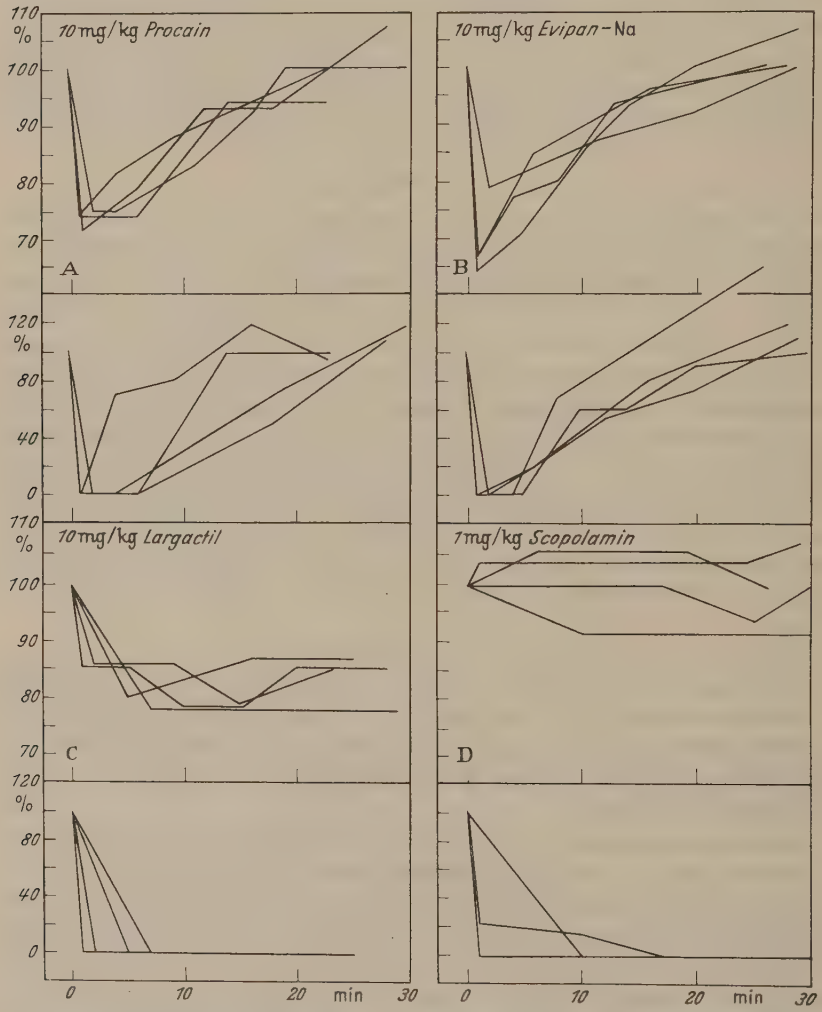


Abb. 1. Pharmakologische Beeinflußbarkeit von 2 Merkmalen der durch retikuläre Reizung auslösbaren „arousal reaction", und zwar der initialen Hippocampusfrequenz (oben) und der Dauer der corticalen „arousal reaction" (unten). Pro Substanz je 4 Versuche. Abszisse: Zeit in Minuten nach der Injektion von 10 mg/kg Procain (*A*), 10 mg/kg Evipan (*B*), 10 mg/kg Largactil (*C*) und 1 mg/kg Scopolamin (*D*). Ordinaten: Initiale Hippocampusfrequenz (oben) und Dauer der corticalen „arousal reaction" (unten) in Prozenten der Ausgangswerte (Ausgangswert = 100%)

In einigen Versuchen wurde die Procaindosis auf 15 mg/kg erhöht. Der für 10 mg/kg Procain beschriebene Effekt hielt hierbei etwas länger an; eine völlige Normalisierung der Reaktion auf retikuläre Reizung trat erst nach 25—30 min ein.

In einigen orientierenden Versuchen wurde auch die Wirkung von 5 mg/kg Cocain und von 2 mg/kg Pantocain untersucht. Auch bei der Verabreichung dieser beiden Lokalanaesthetica trat unmittelbar nach der Injektion eine Verflachung des ECG und eine Regularisierung und Rhythmisierung der Hippocampustätigkeit in Erscheinung. Retikuläre Reizungen, die nach dem Abklingen dieser ECG-Veränderungen durchgeführt wurden, bewirkten ähnlich veränderte Reaktionen, wie sie nach 10 mg/kg Procain beobachtet werden konnten, d. h. Verkürzung der corticalen und rhinencephalen AR und parallel mit dieser Verkürzung eine Abnahme der initialen Hippocampusfrequenz. Eine Normalisierung trat etwa 30 min nach der Injektion ein.

2. Evipan. Innerhalb der ersten 5 min nach der i.v. Injektion von 10 mg/kg Evipan war die corticale AR auf retikuläre Reizung entweder vollständig aufgehoben oder aber es trat während einer solchen Reizung eine modifizierte Art der corticalen AR in Erscheinung, die bereits von Rinaldi u. Himwich (1955c) beschrieben wurde und aus einer hohen und hochfrequenten Tätigkeit besteht. Die rhinencephale AR war zu diesem Zeitpunkt auf 2—5 sec verkürzt, die initiale Hippocampusfrequenz von durchschnittlich 7 Hz vor der Behandlung auf etwa 4,5—5,5 Hz herabgesetzt. Mit abnehmender Narkosetiefe, etwa von einem Zeitpunkt von 10 min nach der Injektion an, nahmen corticale und rhinencephale AR auf retikuläre Reizung allmählich an Dauer zu, wobei die corticale AR auch wieder die am nicht vorbehandelten Tier nachweisbaren Charakteristica aufwies. Parallel mit der Zunahme der Dauer der AR stieg auch die initiale Hippocampusfrequenz wieder zu ihrem Ausgangswert an. Eine völlige Normalisierung war 20—30 min nach der Injektion erreicht. Die beschriebenen Evipan-Wirkungen sind in Abb. 1 B und 2 B dargestellt.

Neben der angegebenen Evipan-Dosis wurden auch Versuche mit 5 und 20 mg/kg Evipan durchgeführt. 5 mg/kg Evipan verkürzten die AR weniger stark als 10 mg/kg und senkten zum Zeitpunkt der maximalen Wirkung auch die initiale Hippocampusfrequenz nur auf 80—90% des Ausgangswertes. Unmittelbar nach der Injektion von 20 mg/kg Evipan war andererseits die corticale und rhinencephale AR auf retikuläre Reizung völlig aufgehoben. Eine rhinencephale AR war erstmalig 5—10 min nach der Injektion wieder auslösbar und zeigte eine initiale Frequenz von 4—4,5 Hz. Die vollständige Normalisierung erforderte eine Zeit von 30—40 min.

3. Largactil. Nach der Injektion einer relativ hohen Largactil-Dosis — 10 mg/kg — war eine retikuläre Reizung nicht mehr imstande, eine

corticale AR auszulösen. Wie aus Abb. 1C und 2C hervorgeht, blieb jedoch die rhinencephale AR, wenn auch etwas verkürzt, erhalten. Gleichzeitig war die initiale Hippocampusfrequenz auf durchschnittlich 82,5% ihren Ausgangswertes herabgesetzt. Innerhalb der Beobachtungszeit (30 min) trat keine Tendenz zur Normalisierung in Erscheinung.

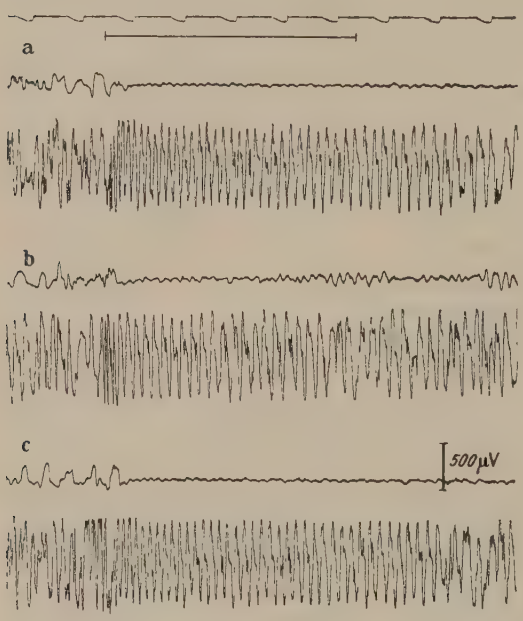


Abb. 2A

Abb. 2A—D. Kaninchen-EEG während retikulärer Reizung (Reizmarkierung: horizontaler Balken jeweils in der obersten Kurve). Je 2 Ableitungen: Präzentraler Cortex — parietaler Cortex (oben) und Hippocampus (unten). Zeitschreibung (in der obersten Kurve) in Sekunden. A: Vor der Behandlung (*a*); 4 min nach 10 mg/kg Procain (*b*); 18 min nach der Injektion (*c*). B: Vor der Behandlung (*a*); 5 min nach 10 mg/kg Evipan (*b*); 12 min nach der Injektion (*c*); 42 min nach der Injektion (*d*). C: Vor der Behandlung (*a*); nach 0,5 mg/kg Largactil (*b*); nach 2,5 mg/kg Largactil (*c*). D: Vor der Behandlung (*a*); nach 0,5 mg/kg Scopolamin (*b*); nach 1 mg/kg Scopolamin (*c*)

In einigen Versuchen wurden Gesamtdosen bis zu 20 mg/kg Largactil in kleineren Einzeldosen aufeinanderfolgend verabreicht. Abb. 3 gibt einen solchen Versuch wieder, bei dem 0,5, 2 und 7,5 mg/kg Largactil in Abständen von je 10 min injiziert wurden. Bereits nach 0,5 mg/kg Largactil war die corticale AR aufgehoben, die rhinencephale etwas verkürzt und die initiale Hippocampusfrequenz von 7 Hz auf 6,5 Hz herabgesetzt. Nach zusätzlicher Verabreichung von 2 mg/kg Largactil sank die initiale Hippocampusfrequenz auf durchschnittlich 6,1 Hz und nach einer weiteren Gabe von 7,5 mg/kg Largactil auf 5,5 Hz. Auch 20 mg/kg Largactil waren in den meisten Versuchen nicht imstande, die rhinencephale AR vollständig aufzuheben, wenn auch häufig Verkürzungen bis auf 2 sec zu beobachten waren.

4. Scopolamin. Nach 1 mg/kg Scopolamin war eine corticale AR durch retikuläre Reizung nicht mehr auslösbar. Die rhinencephale AR war nach der genannten Scopolamin-Dosis meist auf 1—3 sec verkürzt, manchmal sogar vollständig aufgehoben. Es konnte oft beobachtet werden, daß am gleichen Tier manche retikuläre Reizungen die rhinencephale Tätigkeit unbeeinflußt ließen bzw. überhaupt unwirksam waren, während andere

eine eindeutige, wenn auch kurze, rhinencephale AR auslösten, wobei eine Abhängigkeit des Effektes von der Zeit nach der Scopolamin-Injektion nicht bestand. Führte eine retikuläre Reizung nach 1 mg/kg Scopolamin zu einer (kurzen) Regularisierung der Hippocampustätigkeit, dann unterschied sich die initiale Frequenz dieser Tätigkeit in keinem Fall wesentlich von den entsprechenden Werten der Kontrollperiode. Abb. 2D zeigt einen typischen Versuch. In Abb. 1D sind vier derartige Versuche wiedergegeben: es ist daraus ersichtlich, daß bei diesen Versuchen die initialen Hippocampusfrequenzen bei retikulären Reizungen nach Verabreichung von 1 mg/kg Scopolamin zwischen 92 und 106% des Ausgangswertes lagen. Bei drei weiteren Versuchen, deren Ergebnisse der besseren Übersichtlichkeit wegen in Abb. 1D nicht eingetragen sind, verhielten sich völlig gleichartig. Auch eine Abhängigkeit der initialen Hippocampusfrequenz von der Scopolamin-Dosis ließ sich nicht nachweisen. Bei dem in Abb. 3 dargestellten Versuch wurden zunächst zweimal je 0,5 mg/kg Scopolamin und anschließend daran noch 1 mg/kg Scopolamin verabreicht. Nach 0,5 mg/kg Scopolamin war die Dauer der corticalen und rhinencephalen AR etwa auf die Hälfte verkürzt, die initiale Hippocampusfrequenz war jedoch unverändert; nach zusätzlicher Verabreichung von 0,5 mg/kg Scopolamin war die corticale AR auf retikuläre Reizung aufgehoben, die rhinencephale auf 2—3 sec verkürzt, die initiale

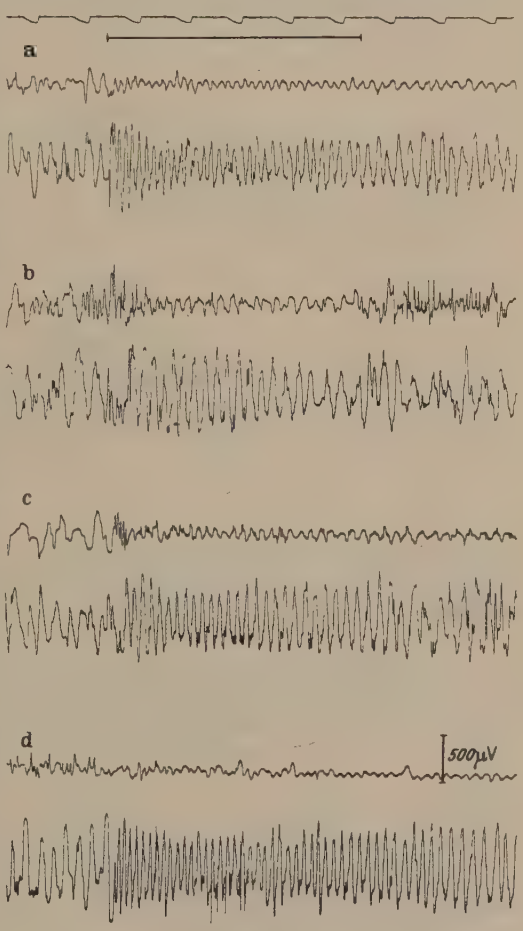


Abb. 2B

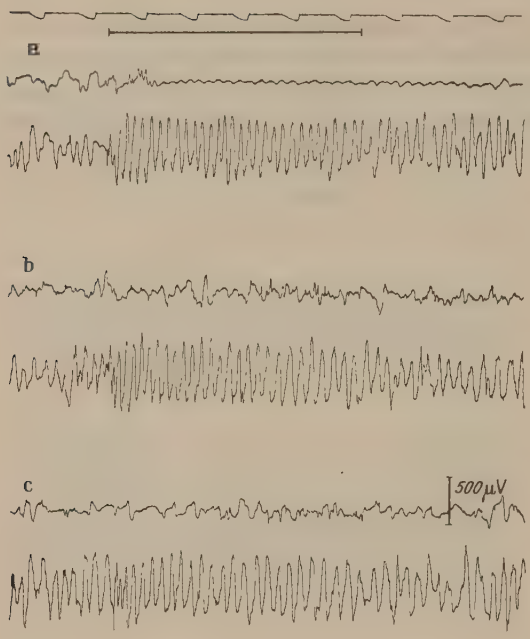


Abb. 2C

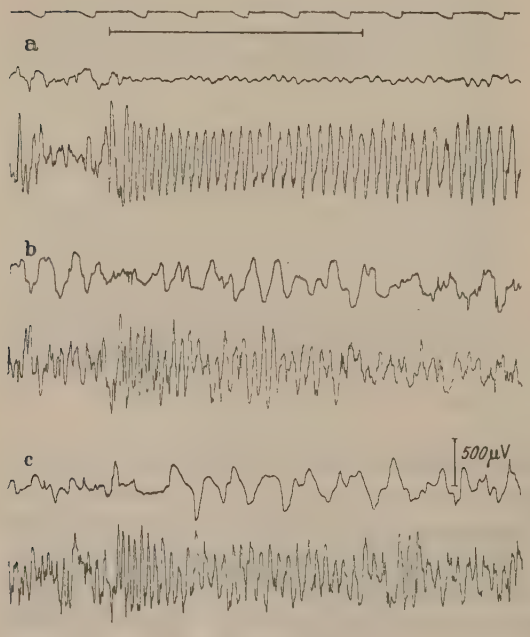


Abb. 2D

Hippocampusfrequenz jedoch wiederum praktisch unverändert; nach zusätzlicher Gabe von 1 mg/kg Scopolamin waren schließlich vereinzelte retikuläre Reizungen wirkungslos, andere hingegen führten zu einer kurzdauernden Regularisierung der Hippocampustätigkeit, deren Frequenz, wie in der Vorperiode 7,5 Hz bzw. einmal 7 Hz betrug.

Diskussion

Die Tatsache, daß Evipan, Largactil und Scopolamin die durch retikuläre Reizung auslösbare AR zu blockieren imstande sind, ist oftmals beschrieben worden (Barbiturate: Arduini u. Arduini; Bernhaut et al.; Derbyshire et al.; Domino; French et al.; Gellhorn; King; Rinaldi u. Himwich 1955c. — Largactil: Bradley u. Hance; Hiebel et al.; Rinaldi u. Himwich 1955d; Longo et al.; Terzian. — Scopolamin bzw. Atropin: Bradley u. Elkes 1953, 1957; Longo, 1956) und bedarf keiner weiteren Diskussion. Unsere Versuche haben gezeigt, daß Procain, Pantocain und Cocain einen

gleichartigen Effekt entfalten. In diesem Zusammenhang ist vielleicht von Interesse, daß intravenöse Zufuhr von Procain beim Menschen eine allgemeine Analgesie hervorzurufen vermag (KEATS et al.).

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft aller von uns untersuchten Pharmaka besteht darin, daß nach Verabreichung bestimmter Dosen dieser Substanzen die durch retikuläre Reizung auslösbare AR cortical völlig aufgehoben sein kann, während sie im Hippocampus auch bei einer Erhöhung der Dosierung noch deutlich nachweisbar ist. In einer früheren Arbeit (SAILLER u. STUMPF 1957a) hatten wir feststellen können, daß schwache retikuläre Reize, die die bioelektrische Tätigkeit des Cortex unbeeinflußt lassen, immer noch zu einer Regularisierung und Rhythmisierung der Hippocampustätigkeit führen können. Der Hippocampus wird somit vom ascendierenden retikulären System aus leichter und bereits durch schwächere Reize beeinflußt als der Cortex. Es ist daher verständlich, daß Substanzen, die die AR blockieren, indem sie im Sinne einer Abschwächung des retikulären Reizes wirken, in bestimmter Dosierung die corticale AR aufheben können ohne die rhinencephale wesentlich zu beeinflussen.

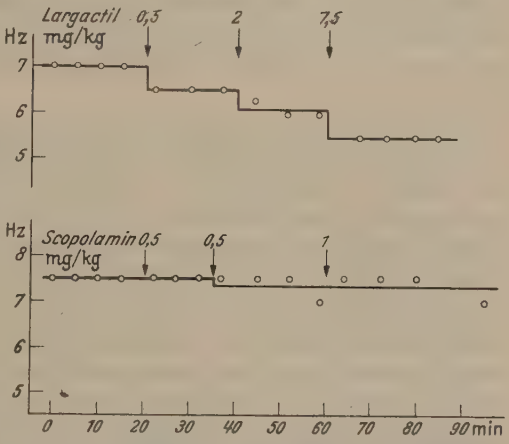


Abb. 3. Abhängigkeit der initialen Hippocampusfrequenz der durch retikuläre Reizung ausgelösten rhinencephalen „arousal reaction" von der Largactil- (oben) bzw. Scopolamin-Dosis (unten). Abszisse: Zeit in Minuten; Ordinate: initiale Hippocampusfrequenz in Hz

Unter der Wirkung von Procain, Evipan und Largactil wurde gleichzeitig mit der Verkürzung der corticalen und rhinencephalen AR auf retikuläre Reizung auch die initiale Hippocampusfrequenz der rhinencephalen AR herabgesetzt. Diese Pharmaka hatten daher in jeder Beziehung denselben Effekt, wie er auch durch Herabsetzung der Intensität des retikulären Reizes hätte erzeugt werden können (SAILER u. STUMPF 1957a). Tatsächlich scheint ja zumindest für Barbiturate und Largactil festzustehen, daß diese Substanzen eine Hemmung bzw. Erregbarkeitsherabsetzung des aszendierenden reticulären Systems bewirken (ARDUINI u. ARDUINI; BRADLEY u. ELKES 1957; BRADLEY u. HANCE; HIEBEL et al.; FRENCH et al.; RINALDI u. HIMWICH 1955d; TERZIAN). Scopolamin verhielt sich in unseren Versuchen andersartig; dieses Parasympathicolyticum bewirkte zwar wie Procain, Evipan und

Largactil eine Verkürzung der corticalen und rhinencephalen AR, jedoch ohne gleichzeitige Herabsetzung der initialen Hippocampusfrequenz. Dieser Befund ist nicht ganz verständlich, weil ja nach der heute allgemein vorherrschenden Ansicht Parasympathicolytica die Funktion des ascendierenden retikulären Systems in gleicher Weise hemmen sollen wie etwa Barbiturate und Largactil (Longo 1956; Rinaldi u. Himwich 1955a, b). Immerhin wurde wiederholt nachgewiesen, daß Atropin und Scopolamin das Verhalten der Tiere zum Unterschied von Barbituraten und Largactil kaum beeinflussen und die durch retikuläre Reizung auslösbare Verhaltens-AR ebenfalls unbeeinflußt lassen (Bradley u. Key; Longo 1956).

Nach Longo (Longo 1955; Longo et al.) und Rinaldi u. Himwich (1955a, b) liegt der Funktion des ascendierenden retikulären Systems ein cholinerger Mechanismus zugrunde. Für diese Hypothese konnten wir kürzlich weitere Hinweise liefern (Sailer u. Stumpf 1957b). Andere Autoren (Bradley u. Elkes 1957; Bradley u. Key) sind allerdings der Meinung, daß das ascendierende retikuläre System „nicht vorwiegend cholingergisch" sei. Nimmt man jedoch an, daß Acetylcholin der Überträgerstoff ascendierenden retikulären System ist, so müßte die Funktion dieses Systems durch Substanzen gehemmt werden, für die eine blokkierende Wirkung zumindest an anderen cholinergen Synapsen nachgewiesen werden kann; vorausgesetzt allerdings, daß sich die Synapsen des ascendierenden retikulären Systems, auch wenn sie cholinerg sind, gegenüber solchen Substanzen gleichartig verhalten wie periphere cholinerge Synapsen. Lokalanästhetica, Barbiturate und Largactil hemmen tatsächlich die Übertragung an peripheren Synapsen und dieser Eigenschaft wird die Wirkung dieser Substanzen auf das ascendierende retikuläre System zugeschrieben (Lokalanästhetica: Atanackovic et al.; Dutta; Harvey; Hazard. — Barbiturate: Arduini u. Arduini; Larrabee u. Posternak. — Largactil: Courvoisier et al.; Longo et al.). Nach der klassischen Ansicht üben demgegenüber Atropin und Scopolamin keinen Einfluß auf die nicotinartigen Wirkungen des Acetylcholins aus; allerdings konnte Dutta zeigen, daß auch diese Substanzen die Erregungsübertragung im Ganglion cervicale sup. blockieren. Unterschiede in der Wirkung auf die synaptische Erregungsübertragung zwischen Scopolamin einerseits und Barbituraten, Procain und Largactil andererseits können daher nicht ohne weiteres für die erwähnten unterschiedlichen zentralen Wirkungen dieser Substanzen verantwortlich gemacht werden.

Zusammenfassung

An Kaninchen wurde die Wirkung von Procain, Evipan, Largactil und Scopolamin auf die durch retikuläre Reizung auslösbare corticale und rhinencephale AR unter besonderer Berücksichtigung der Frequenz

der rhinencephalen AR untersucht. Es konnten hierbei folgende Befunde erhoben werden:

1. Alle 4 Substanzen verkürzen die Dauer der corticalen und rhinencephalen AR. In bestimmten Dosenbereichen kann mit diesen Substanzen die corticale AR bei — wenn auch verkürzt — erhaltener rhinencephaler AR aufgehoben werden.

2. Procain, Evipan und Largactil führen gleichzeitig mit der Verkürzung der AR zu einer Herabsetzung der Frequenz der im Rahmen dieser Reaktion auftretenden rhinencephalen Tätigkeit. Zum Unterschied davon beeinflußt Scopolamin die Frequenz dieser Tätigkeit praktisch nicht.

Anmerkung bei der Korrektur. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Gangloff und Monnier (Helv. Physiol. Acta **15**, 83, 1957) wird unter anderem über die Wirkung von *Serotonin* auf das EEG nicht narkotisierter Kaninchen berichtet. In der Abb. 6a dieser Arbeit (S. 92) ist der Effekt einer hochfrequenten Reizung der Substantia reticularis des Mittelhirns vor und 1 Std nach 1 mg/kg Serotonin dargestellt. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, wird die Frequenz der subcorticalen „arousal reaction" durch Serotonin von etwa 7 Hz auf etwa 4,5 Hz gesenkt. Die Autoren bemerken hierzu, daß "the arousal reaction is .... decreased or even abolished in the cortex and subcortex 30 min. or 1 hour after the injection". Nichtsdestoweniger zeigt dieser Befund, daß neben Evipan, Procain und Largactil auch Serotonin imstande ist, die Frequenz der rhinencephalen „arousal reaction" zu senken. In diesem Zusammenhang ist der Befund von Marrazzi und Hart (Science **121**, 365, 1955) von Interesse, daß Serotonin ebenfalls die synaptische Übertragung (im optischen Cortex der Katze) blockiert.

Literatur

Arduini, A., u. M. G. Arduini: Brit. J. Pharmacol. **110**, 76 (1954). — Atanackovic, D., u. Sv. Dalgaard-Mikkelsen: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 1 (1951). — Bernhaut, M., E. Gellhorn u. A. T. Rasmussen: J. of Neurophysiol. **16**, 21 (1953). — Bradley, P. B.: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Suppl. III, 21 (1953). — Bradley, P. B., u. A. J. Hance: J. of Physiol. **129**, 50 P (1955). — Bradley, P. B., u. J. Elkes: J. of Physiol. **120**, 14 P (1953). — Brain **80**, 77 (1957). — Bradley, P. B., u. B. J. Key: XX. Int. Physiol. Kongr., Brüssel, 1956, p. 124. — Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky u. P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — Derbyshire, A. J., B. Rempel, A. Forbes u. E. F. Lambert: Amer. J. Physiol. **116**, 577 (1936). — Domino, E. F.: Brit. J. Pharmacol. **115**, 449 (1955). — Dutta, N. K.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 197 (1949). — French, J. D., M. Verzeano u. H. W. Magoun: Arch. of Neur. **69**, 519 (1953). — Funderburk, W. H., u. T. J. Case: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **3**, 213 (1951). — Gellhorn, E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 434 (1953). — Green, J. D., u. A. Arduini: 19. Int. Physiol. Kongr., Montreal, 1953. — J. of Neurophysiol. **17**, 533 (1954). — Harvey, A. M.: Bull. Johns Hopkins Hosp. **65**, 223 (1939). — Hazard, R.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **136**, 458 (1947). — Hiebel, G., M. Bonvallet u. P. Dell: Semaine Hôp. **1954**, 2346. — Jung, R., u. A. E. Kornmüller: Arch. f. Psychiatr. u. Z. f. d. ges. Neur. **109**, 1 (1939). — Keats, A. S., G. L. D'Alessandro u. H. K. Beecher: Arch. of Neur. **147**, 1761 (1951). — King, E. E.: J. of Pharmacol. **116**, 404 (1956). — Larrabee, M. G., u.

J. M. Posternak: J. of Neurophysiol. **15**, 91 (1952). — Longo, V. G.: Experientia **11**, 76 (1955). — J. of Pharmacol. **116**, 198 (1956). — Longo, V. G., G. P. v. Berger u. D. Bovet: J. of Pharmacol. **111**, 349 (1954). — Monnier, M., u. H. Laue: Helvet. physiol. Acta **11**, 73 (1953). — Rinaldi, F., u. H. E. Himwich: Arch. of Neur. **73**, 387 (1955a). — Arch. of Neur. **73**, 396 (1955b). — Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955c). — Dis. Nerv. Syst. (New York) **16**, 133 (1955d). — Rose, M.: J. Psychol. u. Neur. **43**, 353 (1931). — Sailer, S., u. Ch. Stumpf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 63 (1957). — 23. Tagung der Deutsch. Pharmakol. Ges., Freiburg (1957b). — Terzian, H.: Rass. Neur. veget. **9**, 211 (1952). — Revue neur. **91**, 445 (1954). — Wikler, A.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **79**, 261 (1952).

Prof. Dr. F. Brücke, Pharmakologisches Institut der Universität Wien (Österreich)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 279—285 (1957)

Aus dem Hallerianum Bern

Die Schutzwirkung der Dinitrile gegen Vergiftungen mit Botulinus Toxin A

Von
NICOLAS GOSSWEILER

(Eingegangen am 27. Mai 1957)

In einer 1822 erschienenen Monographie beschreibt JUSTINUS KERNER[19] erstmals den Verlauf einer Botulinusvergiftung. Nach ihm haben sich besonders HALL[10] und MEYER et al.[21,26] mit der Epidemiologie des Botulismus befaßt[8,10,11,12,15]. Basierend auf den Arbeiten von HEYMANS und MASOIN[13,14] zeigten KOENIG[20] und MARTINI u. PATTAY[25], daß einigen Dinitrilen, insbesondere dem Succinodinitril eine regenerationsfördernde Wirkung zukommt, nach mechanischer Schädigung des Nerven. Es soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob einigen Dinitrilen eine Schutzwirkung auf ein durch ein Neurotoxin geschädigtes Nervensystem zukommt.

Für die Versuche wurde *Succinodinitril* ($CN\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CN$) und das *Chlorhydrat des N N'-Diäthylcyanid-1-2 Diaminoäthyl* verwendet.

$$CN—\underset{H}{CH_2CH_2}\ NCH_2CH_2N\ \underset{H}{CH_2CH_2CN}\ 2HCl$$ (Abkürzung: CDD)

Beide aliphatischen Dinitrile zeichnen sich durch geringe Toxicität aus. Sie wurden uns freundlicherweise durch die Fa. A.G. vorm. B. Siegfried, Zofingen, welcher wir an dieser Stelle herzlich danken, geliefert.

Methodik

Die Toxicität der verwendeten Dinitrile. 1. Succinodinitril, Molekulargewicht 80 LD 50, sc 60 mg/kg Maus, i. v. 40 mg/kg Maus; 2. CDD, Molekulargewicht 238, bei 2000 mg/kg Maus keine Lätalität.

Das Botulinustoxin[18,31,34,35,39]. Es wurde ein kristallines Botulinustoxin vom Typus A benützt, hergestellt nach der Methode von LAMANNA u. MCELROY[18,22,23,31,34,35,39]. N-Gehalt 0,2 mg/ml, Puffer Po_4 0,1 m, p_H 6,8, LD50 $22 \cdot 10^{-5}$, berechnet nach REED u. MUENCH[36] für weiße Mäuse von 18—20 g Gew. Die PO_2 Pufferlösung zeigte auf die Versuchstiere keine toxische Wirkung.

Versuchstiere. Gestützt auf einen persönlichen Vorschlag von LAUFFER[24] wurden Goldfische (carassius auratus) gewählt. Die Verwendung des gemeinen Goldfisches als Testobjekt zur Prüfung von Pharmaka ist nicht neu. PITTENGER u. VANDERKLEED[31,32] testeten 1915 Digitalisextrakte mit dem Goldfisch und CARTWRIGHT u. LAUFFER[4] bestimmten damit die Toxicität des Botulinustoxin. Die einfache Wartung, der geringe Platzbedarf und der niedere Preis begünstigen die Wahl

des Goldfisches. Infolge der geringeren Empfindlichkeit des Goldfisches gegenüber Botulinustoxin werden etwaige kleinere Dosierungsfehler eher ausgeglichen, als bei Warmblütern*.

Die verwendeten Goldfische waren 6—8 cm lang und 7—9 g schwer. Zur Injektion des Toxins und der Dinitrile wurden Tuberkulinspritzen mit einer auf 6 mm Länge verkürzten Nadel verwendet. Die Nadelspitze betrug 1,2 mm. Injiziert wurde in der Mitte zwischen dem proximalen Ende der beiden Brustflossen (Intraperitoneale Injektion). Der Fisch wird am besten in der hohlen Hand zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten. Um eine gute Verteilung der injizierten Lösung zu erhalten, wurden nie mehr als 0,05 ml injiziert. Um eine zu häufige Verletzung der Tiere zu vermeiden, wurde nur jeden 2. Tag injiziert und dabei peinlich darauf geachtet, daß jedesmal die Injektionsstelle neu gewählt wurde. Ein Fisch erhielt nie mehr als 6 Injektionen. Nach 7 Injektionen von Pufferlösung blieb die Empfindlichkeit gegenüber Botulinustoxin unverändert. Das Schuppenkleid muß geschont werden. Die Gefahr von Darmverletzungen ist gering. Von 150 Fischen, die seziert wurden, wiesen nur 2 Darmverletzungen auf. Die Fische wurden in durchlüfteten Aquarien von 10—12 l gehalten. Auf jedes Aquarium entfielen 10—12 Fische. Das Wasser wurde alle 48 Std erneuert. Die Temperatur war 28—30° C. Bei einer Temperatur von 37° C ist die Empfindlichkeit des Fisches gegenüber Botulinustoxin gleich wie bei der weißen Maus. Da bei dieser Temperatur die wöchentliche Mortalität höher als 1,1% war, wurden die Versuche bei 28° C bis 30° C durchgeführt. Als Kriterium zur Bestimmung des Todes wurden die Kiemenbewegungen gewählt. Fische, die innerhalb der ersten 12 Std nach der Botulinusinjektion starben, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt[17].

Ergebnisse

I. Prophylaktische Wirkung von SDN

Je 50 Versuchsfische. Durchschnittsgewicht 8 g. 8tägige Vorbehandlung.

Dosierung. Total 160 mg SDN pro kg Fisch (20 mg pro kg und Tag). Botulinustoxin A LD 90.

Mittlere Überlebenszeit der mit SDN und Botulinus behandelten Fische: 115,6 Std, der nur mit Botulinus vorbehandelten Fische 81,5 Std, $p = 0{,}001$ (hoch signifikant).

Dauer der Messungen: 120 Std, d. h. bis die Sterblichkeit der Versuchstiere derjenigen entsprach, die allgemein erwartet werden konnte (3—4% innerhalb 7 Tagen).

Mortalität. SDN + Botulinus 70%; Botulinus allein 80%.

II. Therapeutische Wirkung von SDN

Je 50 Versuchsfische. Durchschnittsgewicht 8 g.

Dosierung. SDN 50 mg pro kg Fisch und Tag; Botulinustoxin A LD 60 pro Fisch. Nachbehandlung während 8 Tagen.

---

* Herrn Prof. Max Lauffer, Pittsburgh, der mir das Toxin zur Verfügung stellte, sei für seine wertvolle Hilfe herzlich gedankt.

Mittlere Überlebenszeit der mit SDN und Botulinus behandelten Fische: 101,5 Std; der nur mit Botulinus behandelten Fische: 91,5 Std. Dauer der Messungen: 156 Std. Resultate nicht signifikant.

Mortalität. SDN + Botulinus 52%; Botulinus allein 63%.

III. Prophylaktische Wirkung von SDN und aliphatischem Dinitril

30 Fische wurden mit SDN vorbehandelt (8 Tage). 24 Fische wurden mit dem aliphatischen Dinitril vorbehandelt (8 Tage). 36 Fische erhielten Botulinustoxin A allein.

Dosierung. Total 180 mg SDN pro kg (22,5 mg pro kg und Tag); aliphatisches Dinitril 300 mg pro kg (37,5 mg/kg und Tag); Botulinustoxin LD 100 für alle Fische. Dauer der Vorbehandlung mit Dinitrilen: 8 Tage.

Mittlere Überlebenszeit. Succinodinitril + Botulinustoxin 79,1 Std; Aliphatisches Dinitril + Botulinustoxin 93,2 Std; Botulinustoxin allein 62,9 Std. $p = 0{,}001$ (hoch signifikant). Dauer der Messungen: 156 Std.

Mortalität. SDN + Botulinus 96,7%; Aliphatisches Dinitril + Botulinus 62,5%; Botulinus allein 97,2%.

IV. Gleiche Versuchsanordnung wie unter III, jedoch wurden LD 110 Botulinustoxin gegeben

Mittlere Überlebenszeit. Succinodinitril + Botulinus 39 Std (hoch signifikant); Aliphatisches Dinitril + Botulinustoxin 37 Std (signifikant); Botulinustoxin allein 24,6 Std.

Mortalität. SDN + Botulinus 95%; Aliphatisches Dinitril + Botulinus 100%; Botulinus allein 100%.

Warmblüterversuche

Die Wirksamkeit des SDN als Schutz gegenüber dem Botulinustoxin beim Kaltblüter läßt nicht ohne weiteres den Schluß zu, daß auch beim Warmblüter die gleiche Wirkung bestehe. Durch Warmblüterversuche sollte auch abgeklärt werden, ob SDN eine Schutzwirkung gegenüber Tetanustoxin besitzt.

I. Versuche mit Mäusen

1. Therapeutische Wirkung. Von 200 weißen Mäusen wurden je 100 mit Botulinustoxin A LD 50 i. p. und Tetanustoxin LD min/Maus i. p. injiziert. Von jeder Serie wurden 50 Tiere 8 Std nach Injektion des Toxins täglich mit 60 mg Succinodinitril pro kg i.p. behandelt.

Mittlere Überlebungszeit. Tetanus: SDN + Tetanus: 52 Std; Tetanus allein: 45,3 Std (signifikant).

Botulinus: SDN + Botulinus: 55 Std; Botulinus allein: 58 Std (nicht signifikant).

Mortalität. Tetanus allein 98%; SDN + Tetanus 94%; Botulinus allein 56%; SDN + Botulinus 62%.

2. Prophylaktische Wirkung. Sowohl bei den mit Tetanus, wie bei den mit Botulinustoxin vergifteten Mäusen war die Überlebenszeit der unbehandelten Tiere gegenüber derjenigen der behandelten Tiere verlängert.

II. Versuche mit Meerschweinchen

Prophylaxe. Die prophylaktische Wirkung wurde auch am Meerschweinchen versucht. Von 24 Tieren wurden je 8 während 8 Tagen mit 50 mg/tägl. kg Körpergewicht SDN und 50 mg/tägl. kg aliphatischem Dinitril vorbehandelt. 8 Tiere erhielten nur Botulinustoxin. Sämtliche Tiere erhielten LD 50 Botulinustoxin pro Tier i. p.

Mittlere Überlebenszeit. Succinodinitril + Botulinustoxin 90 Std; aliphatisches Dinitril + Botulinustoxin 92 Std; Botulinustoxin allein 78 Std.

Mortalität. SDN + Botulinustoxin 50%; Aliphatisches Dinitril + Botulinustoxin 37,5%; Botulinustoxin allein 50%. Dauer der Messungen 156 Std. Resultate statistisch gesichert $p = 0{,}05$.

III. Das Verhalten der Versuchstiere

1. Fische. Die Wirkung des Toxines konnte im allgemeinen erst nach mehr als 12 Std nach der Injektion festgestellt werden: Verlangsamung der Atembewegung, Aufsuchen der Wasseroberfläche, Schnappbewegungen. Die Kiemen einiger Fische wiesen eine leicht blaurote Verfärbung auf. 6—12 Std ante exitum leichte Gleichgewichts- und Motilitätsstörungen. Ruckartig schlagende Schwanzbewegungen. Schließlich sinken die Fische mit langsam abnehmender Frequenz der Kiemenbewegungen auf den Boden. Diese Symptome dauerten oft bis zu 10 Std. Typisch für alle Fische waren die Gleichgewichtsstörungen.

2. Mäuse. Auch hier Eintritt der Vergiftungssymptome innerhalb von 24 Std. Die Tiere werden unruhig und 6—8 Std später ergreift eine rasch aufsteigende Lähmung die unteren Extremitäten, das Tier liegt unbeweglich, die Abdominalmuskulatur ist schlaff und 3—6 Std nach Auftreten der ersten Lähmungszeichen geht das Tier an Atemlähmung zugrunde.

3. Meerschweinchen. Auch hier starke motorische Unruhe, die bei 85—90% der Tiere zu beobachten war (folie musculaire). Die Tiere rennen herum, pfeifen und drehen sich um ihre Vertikalachse. 3—6 Std später tritt die Lähmung der Atemmuskulatur ein mit eigenartigen Schnappbewegungen von Maul und Nase (signe du nez). Ante exitum sind die hinteren Extremitäten meist vollständig gelähmt. Bei der Sektion weisen alle Tiere eine Autolyse des Darmes auf.

Histologische Untersuchungen

Für Kalt- und Warmblüter konnten keine für die Botulinusvergiftung spezifischen Befunde erhoben werden. Alle Warmblüter wiesen ein starkes Lungenödem auf[21,28,34].

Diskussion der Ergebnisse

Zur Frage der Wirkung der Dinitrile läßt sich nicht sagen, ob sie auf dem Molekül als Ganzem beruht, oder ob sie der Cyangruppe zuzuschreiben ist. Wahrscheinlich dürfte die Cyangruppe für die toxische Wirkung stärker verantwortlich sein, das Gesamt-Molekül dagegen für den therapeutischen Effekt. Die Toxicität wird davon abhängen, wie rasch die Cyangruppe abgespalten wird[16].

1. Fische. Bei dem mit Botulinustoxin A vergifteten Fisch erweist sich das SDN sowie das CDD als eine wirksame Schutzsubstanz. Die Wirkung ist deutlich, wenn das Dinitril in einer Vorbehandlung von etwa 6 bis 8 Tagen gegeben wird. Die gleichzeitige Applikation mit den Toxinen zeigte keine signifikanten Resultate.

Immerhin war hier die Mortalität der Behandelten um 18% geringer, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Toxindosierung etwas geringer gewählt wurde.

Es ist unwahrscheinlich, daß die Dinitrile, ähnlich wie das Serum, das Toxin selbst neutralisieren. Vielmehr scheinen sie am gleichen Ort anzugreifen wie das Toxin. Wie CARTWRIGHT et al.[4] nachweisen, ist die Dauer und die Intensität der Wirkung stark von der Wassertemperatur abhängig. Die angegebenen Letaldosen beziehen sich stets auf eine Wassertemperatur von 30° C.

2. Warmblüter. Nach Vorbehandlung läßt sich hier keine Schutzwirkung der beiden Dinitrile nachweisen, weder gegenüber Botulinustoxin noch gegenüber Tetanustoxin. (Weiße Maus und Meerschweinchen.) Bei den mit Tetanustoxin vergifteten Mäusen hat das SDN eine signifikante therapeutische Wirkung, die Mortalität wurde jedoch nicht herabgesetzt. Es scheint, daß das Tetanustoxin entweder rascher durch den Körper abgebaut werden kann, oder aber, daß die Dinitrile die Wiederstandsfähigkeit des neuromuskulären Systems nur während kurzer Zeit gegenüber Tetanus erhöhen. Die Ähnlichkeit des neurotoxischen Effektes von Botulinus- und Tetanustoxin mit fast gleicher klinischer Symptomatologie (Ophtalmoplegie, Paralys der Nervi linguales et faciei etc.) ist auffällig. AMBACHE[1,2] glaubt aus dieser Tatsache den Schluß ziehen zu können, daß trotz verschiedener Molekulargewichte die aktiven Anteile doch näher verwandt seien, als es den Anschein erweckt. Das Botulinustoxin ist ein Protein, Tetanustoxin gibt proteinähnliche Reaktionen und verursacht eine lokale Reizwirkung auf die Nervenendigungen. Seine

Wirkung ist kurz. Die Wirkung des Botulinustoxin kann dagegen sehr lange dauern (6—12 Monate beim Menschen[9,29,38,40]).

Nach Ansicht von Ambache[1] weist das bei fast allen Tieren gefundene Lungenödem auf eine lecithinaseähnliche Wirkung des Botulinustoxin hin. Anderseits hat die lange Agonie, der die Tiere unterliegen, eine ungenügende Durchblutung des Gehirns zur Folge, die ihrerseits, durch Herabsetzen der Capillarpermeabilität, das Lungenödem auslösen kann. Als Ursache des Ganzen dürfte eine Schädigung des Myocards, die wir überall vorfanden, angesprochen werden.

Im Gegensatz zu anderen Autoren[26,27] wurden keine pathologischen Veränderungen des Gehirns festgestellt. Die übrigen festgestellten Veränderungen an den inneren Organen sind für Botulinustoxin nicht typisch. Die geringen Befunde, die bei Kaninchenversuchen erhoben wurden[3], können damit erklärt werden, daß bei Übergreifen der Lähmung auf die Nasenflügel (Signe du nez) das Tier erstickt, da das Kaninchen nicht durch den Mund atmen kann.

Zusammenfassung

1. Succinodinitril (SDN) und das Chloralhydrat des N N′-Diäthylcyanid-1-2 Diaminoäthyl (CDD) setzten bei dem mit Botulinustoxin A vergifteten Goldfisch die Mortalität herab und verlängern die Überlebenszeit bei prophylaktischer Anwendung.

2. Bei therapeutischer Anwendung wird die Mortalität herabgesetzt, die Überlebenszeit aber nur wenig beeinflußt.

3. Bei der mit Tetanustoxin vergifteten Maus entfaltet SDN nur eine therapeutische Wirkung.

4. Beim mit Botulinustoxin vergifteten Meerschweinchen wirken beide Dinitrile verlängernd auf die Überlebenszeit, jedoch beeinflußt nur das CDD die Mortalität in geringem Maße. Die histologischen Befunde sind nicht spezifisch.

Literatur

[1] Ambache, N.: The peripheral action of Botulinus Toxin A. J. of Physiol. **108**, 127—141 (1949). — [2] Ambache, N.: A further survey of the action of Cl. Botulinus Toxin upon different types of autonomic nerve fibre. J. of Physiol. **113**, 1—17 (1951). — [3] Bishop, G. H., and J. J. Bonfenbrenner: The site of action of Botulinum Toxin. Amer. J. Physiol. **117**, 393—404 (1936). — [4] Cartwright, T. E., and M. A. Lauffer: Assay of Botulinum A Toxin with Goldfish. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 508—511 (1952). — [5] Delay, J., P. Deniker, P. Sizaret et B. Lainé: Les dinitrils en psychiatrie, essais de traitement par le dinitril succinique. Semaine Hôp. 25. année, **95**, 1—6 (1949). — [6] Delay, J., P. Deniker, P. Sizaret, and B. Lainé: Utilisation du dinitril succinique en psychiatrie. Semaine Hôp. 26. année, **65**, 1—3 (1950). — [7] Delay, J., P. Pichot, J. Thuillier et J. P. Marquiset: Action de l'amino-dipropionitril sur le comportement moteur de la souris blanche. C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 533 (1952). — [8] Geiger, J. C.: An outbreak of Botulism. J. Amer. Med. Assoc. **117**, 22 (1941). — [9] Guyton, C., and A. MacDonald: Physiology of Botulinus Toxin. Arch. of Neur. **57**, 578—592 (1947). — [10] Hall, J. C.: New

outbreak of Botulism in western united states. Food Res. **1**, 171—198 (1936), n. Z. Hyg. **39**, 111 (1937). — [11] Hettche, H. O., u. H. Strassburger: Wirkung von Mangan und Kupfersalzen bei letalen Botulinus-Infektionen der Maus. Z. Immunforschung **97**, 109—120 (1939). — [12] v. Heyningen, W. E.: The clostridia from bact. toxins. Oxford: Blackwell 15—19 (1950). — [13] Heymans, J. F.: Über die Entgiftung von Malononitril. Arch. f. Physiol. 157—158 (1897). — [14] Heymans, J.F., et P. Masoin: Etudes physiologiques sur les dinitrils normaux, toxicité relative, phénomènes et mécanique de l'intoxication, action antitoxique de l'hyposulfite de soude vis-à-vis de l'action toxique des dinitrils. Arch. internat. Pharmacodynamie **3**, 77—172 (1897). — [15] Hürthle, R., u. H. Gross: Beitrag zur Infektion mit Bact. Botulinum. Dtsch. med. Wschr. **1934**, 1232—1234. — [16] Hydén, H. E., and H. Hartelius: Stimulation of the Nucleo-protein-Production in the nerv cells by Malononitril and its effect on Psychic Fundations in Mental Disorders. Acta psychiatr. (Copenh.) Suppl. **48** (1948). — [17] Kagan, B., and N. Matiash: The action of proteases on the Toxin of Bact. Bot. Zschr. f. Mikrobiol. **2/3**, 50—58 (1939). — [18] Kegeles, G.: The molecular size and shape of the Botulinus Toxin. Amer. J. Chem. Soc. **68**, 1670—1679 (1947). — [19] Kerner, J.: Das Fettgift. Tübingen: Cotta 1822. — [20] Koenig, M. P.: Über die Wirkung von Dinitrilen auf die Nervenregeneration. Helv. Physiol. Acta **11**, 329—349 (1953). — [21] Komotzki, W.: Wirkung des Botulinus Toxin auf die inneren Organe. Zbl. Bacter. **52**, 647 (1912). — [22] Lamanna, C., and H. N. Glassman: The isolation of type B Botulinum Toxin. J. Bacter. **54**, 575—584 (1947). — [23] Lamanna, C., and McElroy: The purification and cristallisation of Botulinum A Toxin. Science **103**, 613—614 (1946). — [24] Lauffer, M. A., and N. W. Taylor: The influence of the composition upon the sedimentation rate of proteins: III. studies on crystalline Botulinum A Toxin protein[1] (persönl. Mitteilung. Dept. of Biophysics. Univ. of Pittsburgh Pa). — [25] Martini, V., et J. Pattay: Effets des dinitrils malonique et succinique sur la régénération des nerfs de la cornée du lapin. Helv. Physiol. Acta **10**, C 18—20 (1952). — [26] Meyer, K. F., and J. C. Geiger: The distribution of shores of bact. Botulinum in nature. Zbl. Bakter. **74**, 448 (1923). — [27] Meyer, K. F.: Botulismus, Handbuch der path. Mikroorganismen **4**, 1269—1349 (1928). — [28] Mitchell, Ch. A.: Preliminary report on equine Botulism in Canada. Zbl. Bakter. **75**, 202 (1923/24). — [29] Moeller, J.: Zur Behandlung des Botulismus. Dtsch. med. Wschr. **1949**, 1538—1539. — [30] Pillener, L.: Chemistry of Toxins. Ann. Rev. Microbiol. **4**, 274—278 (1949). — [31] Pittenger, P. S., and C. E. Vanderkleed: Carassius auratus as test animals for Digitalis series. J. Amer. pharmaceut. Assoc. **4**, 427—432 (1915). — [32] Pittenger, P. S., and C. E. Vanderkleed: Carassius auratus as test animals for Digitalis series. (Preliminary note for a new Pharmacodynamic Assay method). J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **8**, 893—896 (1919). — [33] Prévot, A. R.: (Institut Pasteur): Persönliche Mitteilung. — [34] Putnam, F. W., C. Lamanna and O. G. Sharp: Molecular wight and homogenity of crystallin Botulinum Toxin A. J. of Biol. Chem. **165**, 735—736 (1948). — [35] Raffael, S.: Types of acquired immunity against infectuous diseases. Ann. Rev. Microbiol. 229—231 (1949). — [36] Reed, L. I., and H. Muench: A simple method of estimating fifty % endpoints. Amer. J. Hyg. **27**, 493—497 (1938). — [37] Steinbruch, W.: Über Serumbehandlung. Zbl. Bakter. (Ref.) **75**, 459 (1923/24). — [38] Wagman, J., and J. B. Bateman: The behavior of Botulinum Toxin in the Ultrazentrifugue. Arch. of Biochem. a. Biophysics **31**, 424—431 (1951). — [39] Wilbur, R., W. Liman and W. Ophuls: Report about an epidemie of Botulinus. Zbl. Bakter. **65**, 430 (1917). (Ref.).

Dr. Nicolas Gossweiler, Hallerianum Bern, Bern/Schweiz, Bühlplatz 5

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 285—291 (1957)

Aus dem Hallerianum Bern

Über die Wirkung von Succinodinitril auf den mit Curare und Botulinustoxin A vergifteten Muskel

Von

Nicolas Gossweiler

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Februar 1957)

Wie aus den Untersuchungen von Martini u. Pattay[15] sowie König[12] hervorgeht, hat das Succinodinitril eine neuroregenerative Wirkung im Tierversuch. In der vorhergehenden Arbeit wurde festgestellt, daß das Succinodinitril die Wirkung des Botulinustoxins verzögert und die Mortalität von Goldfischen herabsetzt. Die Wirkungsweise des Botulinustoxins ist noch nicht sicher erforscht. Ambache[2] glaubt, daß das Toxin hauptsächlich an den peripheren cholinergischen Fasern angreift. Bishop u. Bonfenbrenner[4] beobachteten, daß bei einem mit Botulinustoxin getöteten Tier die Muskeln bei indirekter Reizung sich nicht kontrahieren, bei direkter Reizung aber durchaus normal reagierten. Daraus ziehen die Autoren den Schluß, daß die motorische Endplatte elektiv durch das Botulinustoxin in der Übertragung der Impulse gehemmt wird. Davis et al.[8] konnten durch direkte Injektionen von Botulinustoxin A in die Medulla oblongata neurologische Störungen hervorrufen.

Das Toxin unterbricht die Leitung im peripheren Nerven nicht[2,3,4,7,10]. Ob die Ursache der Blockierung in der Endplatte selbst oder in ihren Terminalfasern liegt, konnten Guyton u. McDonald[9] nicht entscheiden. Torda u. Wolff*[7] glauben, daß die Acetylcholinabgabe durch Zerstörung der Cholinacetylase gehemmt werde, doch ist diese Annahme noch unbewiesen. Brooks[5] nimmt an, daß die Acetylcholinproduktion in der Endplatte durch eine Permeabilitätsänderung an den Nervenendigungen herabgesetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob das Succinodinitril (SDN) eine Wirkung auf die durch Botulinustoxin blockierte Endplatte entfaltet.

Methodik

Ein Phrenicus-Zwerchfellpräparat der Ratte wird nach dem Verfahren von Bülbring[6] modifiziert nach Aebi[1] und Burgen[7] direkt und indirekt gereizt.

Als Badelösung diente Tyrode mit einem Zusatz von 0,2% Glucose, die Lösung wurde durchlüftet mit 95% O_2 und 5% CO_2. Das Badevolumen betrug 100 cm^3. Mit

* zit. nach Burgen et al.

eintauchbaren Elektroden[1] wurde leicht supramaximal gereizt, mit rechteckigen Impulsen von etwa 0,25 msec. Dauer. Die Frequenz betrug 10 Impulse pro Minute. Vor Beginn eines jeden Versuchs wurde das Zwerchfell während einer halben bis einer ganzen Stunde gereizt, um dem durch die Präparation meist leicht geschädigten Muskel durch die Tätigkeit eine gute Erholung in Sauerstoff zu sichern. Erst wenn der Muskel sich regelmäßig kontrahierte, wurde mit dem Versuch begonnen. Kontrollversuche zeigten, daß erst nach 3—4 Std das Zwerchfell zu ermüden beginnt. Manchmal zeigten die Kontraktionen nach 6 und mehr Stunden noch keine Ermüdungssymptome.

Das Botulinustoxin: Beim verwendeten Botulinustoxin handelte es sich um ein kristallines Toxin, hergestellt nach den Angaben von LAMANNA u. MCELROY[14]. Das

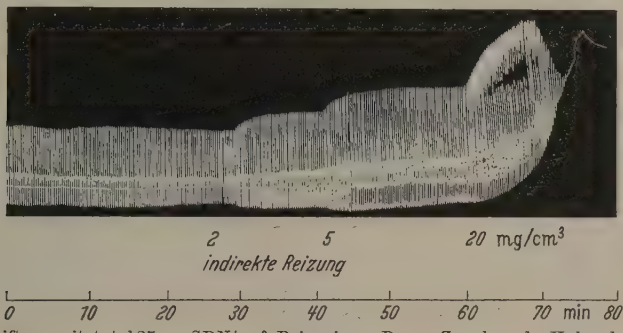


Abb. 1. Vergiftung mit total 27 mg SDN/cm³. Bei geringen Dosen, Zunahme des Hubes, bei 20 mg/cm³ Übergang in Kontraktur

Toxin wurde stets in LD 50 Maus dosiert (1 E = 1 LD 50 Maus). Bei Zufuhr von 3000 E Botulinustoxin zur Badelösung, trat die Lähmung des Zwerchfelles nach 20—30 min ein.

Curare: Es wurde d-Tubocurarinchlorid verwendet.

Resultate

1. Auf das Rattenzwerchfell bewirkt Succinodinitril bei indirekter Reizung eine Erhöhung des Hubes und eine Verringerung der Ermüdbarkeit. Bei direkter Reizung kommt die Wirkung des SDN weniger stark zur Geltung. 2 mg/cc erhöhen die Kontraktionen etwa um 23%, 1 mg/cc SDN etwa um 8%. Die Empfindlichkeit des Zwerchfelles gegenüber SDN schwankt leicht.

2. *Die Vergiftung des Zwerchfelles mit SDN* (Abb. 1). SDN in kürzeren Abständen der Badelösung beigegeben wirkt additiv, die Hubhöhe wird vergrößert, jedoch ohne anfänglich zu Kontrakturerscheinungen zu führen. Reizt man das Zwerchfell über eine Stunde oder länger, so nimmt die Hubhöhe entsprechend der zunehmenden Ermüdung des Muskels regelmäßig ab. Bei 20 mg/cm³ kommt es aber zu einer Hebung der Fußpunkte, einer starken Vergrößerung der Hubhöhe, die langsam zum typischen Bilde der Kontraktur führt. Durch 2 mg/cm³ SDN wurde die Hubhöhe gegenüber der Ausgangslage um 25% erhöht, durch 5 mg/cm³ um 50%

und durch 20 mg um 112%. Im Vergleich zur jeweiligen vorhergehenden Dosierung erhält man folgende prozentuale Erhöhungen:

$$5 \text{ mg SDN/cm}^3 = 25\%$$
$$20 \text{ mg SDN/cm}^3 = 60{,}5\%$$

Die Reaktion ist aber nicht immer gleichmäßig. Es besteht offensichtlich eine von Zwerchfell zu Zwerchfell schwankende Empfindlichkeit gegenüber SDN. Das SDN läßt sich leicht auswaschen. Erst bei hoher

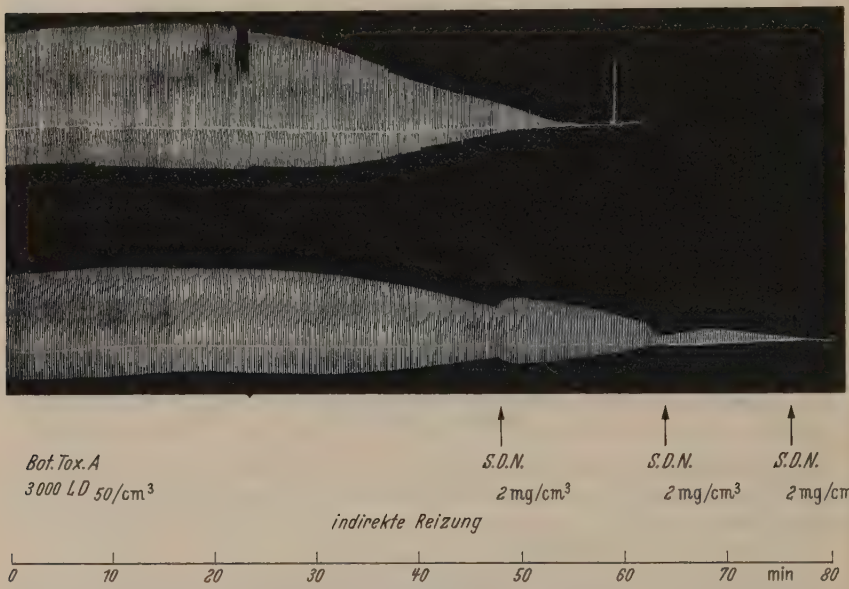


Abb. 2. Zwillingspräparat. Vergiftung beider Zwerchfelle mit 3000 LD_{50}/cm³ Botulinustoxin A. Succinodinitril dem unteren Zwerchfell beigegeben, bewirkt eine vorübergehende Vergrößerung des Hubes und eine Verlängerung der Muskeltätigkeit

Dosierung geht die Hubhöhe nicht mehr ganz auf die Ausgangslage zurück, die Kontraktur ist irreversibel. Aebi, Aebi u. von Muralt[1] erhielten bei Vergiftung des Muskels mit Coffein eine ähnliche, ebenfalls irreversible Kontraktur des Muskels, wie die Abbildung für SDN zeigt.

3. *Vergiftung des Zwerchfelles mit Botulinustoxin A* (Abb. 2). Ein Zwillingspräparat wurde verwendet und die beiden indirekt gereizten Zwerchfellhälften mit je 3000 E/cm³ Botulinustoxin A vergiftet. Nach 20 min trat eine Verringerung der Hubhöhe um 50% gegenüber der Ausgangslage auf, gefolgt von einer leichten Hebung der Fußpunkte. Nach 48 min, d. h. 28 min nach Beginn der Toxinwirkung, wurde der Badelösung des einen Präparates 2 mg SDN/cm³ zugefügt:

Die Hubhöhe wurde sofort um 16% vergrößert, um nach 7—8 min regelmäßig auf 10% der Ausgangslage abzufallen. 18 min später wurde erneut 2 mg SDN/cm³ der Badelösung zugefügt.

Die Hubhöhe wurde um 7% erhöht. Auch hier wiederum das charakteristische Verhalten des Hubes: Erhöhung mit darauffolgendem langsamem Absinken. Die Lähmung des Muskels konnte um 30 min verzögert werden. Burgen et al.[7] erhielten in derselben Versuchsanordnung mit Veratrin und Prostigmin eine im Vergleich zur SDN-Wirkung sehr schwache Veränderung der Kurve. Weder Veratrin noch Prostigmin konnten die Lähmung verzögern. Im Unterschied zu den vorgenannten Autoren wurde eine höhere Toxinkonzentration verwendet, dies mag

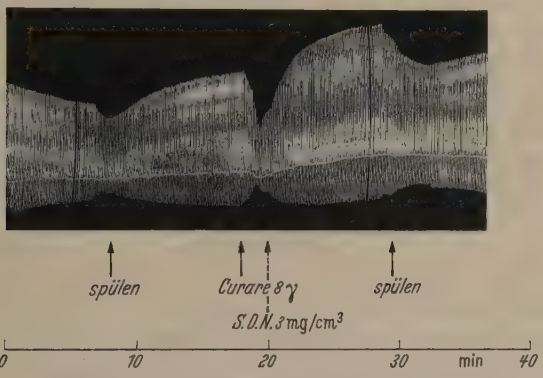


Abb. 3. Vergiftung mit Curare. Succinodinitril hebt die Wirkung von Curare selbst nach kurzdauernder Blockierung

wohl die etwas kürzere Latenzzeit erklären. Diese unterliegt im allgemeinen recht geringen Schwankungen. Bei 30 Präparaten, die mit 3000 E/cm³ geprüft wurden, varierte die Latenzzeit um $\pm$ 9 min.

4. *Vergiftung mit Curare* (Abb. 3). Blockiert man ein indirekt gereiztes Zwerchfell mit Curare und gibt man 3 mg SDN pro Kubikzentimeter Badelösung, so steigt die Hubhöhe innerhalb von 5—10 min auf die Ausgangslage zurück, um nach weiteren 5—10 min dieselbe regelmäßig um 20—30% zu übertreffen. Ohne Durchspülung mit Tyrode verändert sich der Hub kaum.

Nach 10 min kann das SDN nicht mehr restlos ausgewaschen werden. Die Hubhöhe bleibt 5—10% über der Ausgangslage.

5. *Zur Frage der depolarisierenden Wirkung von SDN.* Um einen depolarisierenden Effekt des SDN nachzuweisen, wurden die Ruhepotentiale der Zwerchfellmuskelfaser gemessen*. Die Messung des Ruhepotentials erfolgte nach der Methode von Ling u. Gerard[14]. Pro Zwerchfell wurden je 60 Messungen durchgeführt: 20 mit Tyrodelösung, 20 mit SDN und 20 nach erneutem Auswaschen mit Tyrode. Der

* Herrn PD. Dr. S. Weidmann, der diese Messungen durchführte, bin ich hierfür zu größtem Dank verpflichtet.

Einfachheit halber werden die Messungen, die an 4 Zwerchfellen durchgeführt wurden, eine Serie genannt

	ohne SDN	mit SDN 8%	nach Spülen
1. Serie	85,2	77,4	82,0
2. Serie	84,1	85,4	86,3 (Pot. in mV)

Es wurden total 160 Messungen durchgeführt. Nur in der 1. Serie konnte durch SDN eine leichte Senkung des Potentials erreicht werden, jedoch waren die Differenzen statistisch nicht signifikant. In der 2. Serie erhöhte sich nach Zugabe von SDN das Potential. Nach Spülen übertraf das Potential (86,3 mV) dasjenige der Ausgangslage. Infolge der geringen Anzahl Messungen kann es sich hier nur um einen orientierenden Versuch handeln. Mit Sicherheit läßt sich eine depolarisierende Wirkung von mehr als 10 mV ausschließen. Ob eine geringere depolarisierende Wirkung besteht, können nur ausgedehnte Untersuchungen zeigen.

Diskussion

Zur Frage des Angriffsortes des SDN: Eine neurotrope Wirkung des Succinodinitril ist seit längerer Zeit bekannt[11,12]. Aus den vorliegenden Versuchen geht hervor, daß SDN eine bedeutend stärkere Wirkung beim indirekt gereizten Muskel entfaltet. Auffallend ist die Ähnlichkeit der Kontrakturkurve zwischen SDN und Coffein[1].

Zur Wirkung von Botulinustoxin und Curare: Nach einem von der Dosierung unabhängigen Intervall erzeugt Botulinustoxin nur am indirekt gereizten Zwerchfell eine Lähmung. Daß diese Latenzzeit nicht durch die langsame Diffusion des Moleküls bedingt ist, wird dadurch bewiesen, daß nach Auswaschen des Präparates die Lähmung trotzdem eintritt. Nach Burgen et al.[7] soll das Toxin an der Endplatte gewisse Stoffwechseländerungen bewirken, die schließlich zum Block führen. Die Abhängigkeit der Latenzzeit von der Temperatur weist eher auf einen chemischen Prozeß hin. Der Block wird durch SDN verzögert. Ein gleicher Angriffsort für SDN und für Botulinustoxin ist nicht auszuschließen.

Nach Ambache und Burgen et al.[2,7] verhindert Curare die Acetylcholinfreisetzung nicht. SDN hebt den Curareeffekt innert 3—4 min auf. Dies scheint darauf zu beruhen, daß die Endplatte durch SDN gegenüber Acetylcholin sensibilisiert wird. Botulinustoxin hemmt die Acetylcholinfreisetzung, somit wirkt das SDN nur solange an der Endplatte, als überhaupt von dieser Acetylcholin abgegeben wird.

Zusammenfassung

SDN (Succinodinitril) verzögert die Blockierung des indirekt gereizten Zwerchfelles durch Botulinustoxin. Es hebt die Curarewirkung auf. Auf den unvergifteten Muskel wirkt das Succinodinitril tonisierend.

Literatur

[1] Aebi, H., L. Aebi u. A. v. Muralt: Die Wirkungen von Coffein auf das isolierte Nerv-Zwerchfellpräparat der Ratte und deren quant. Auswertung. Helv. physiol. Acta **10**, 303—318 (1953). — [2] Ambache, N.: The peripheral action of Botulinus Toxin A. J. of Physiol. **108**, 127—141 (1949). — [3] Ambache, N.: A further survey of the action of Cl. Botulinus Toxin upon different types of autonomic nerve fibre. J. of Physiol. **113**, 1—17 (1951). — [4] Bishop, G. H., and J. J. Bronfenbrenner: The site of action of Botulinus Toxin. Amer. J. Physiol. **117**, 393—404 (1936). — [5] Brooks, V. B.: Motor nerve filament block produced by Botulinus Toxin. (Vor. am int. Physiol. Kongreß Montreal 31. 8./4. 9. 53). — [6] Bülbring, E., and T. C. Chou: The relative activity of Prostigmine homologues and other substances as antagoists to tubocurarine. Brit. J. Pharmacol. **2**, 8—22 (1947). — [7] Burgen, A. S. V., F. Dikkens and L. J. Zatman: The action of Botulinus Toxin on the neuro-muscular junction. J. of Physiol. **109**, 10—24 (1949). — [8] Davies, J. R., R. S. Morgan, E. A. Wright and G. P. Wright: The results of direct injection of Botulinus Toxin A into the central nervous system of rabbits. J. of Physiol. **120**, 618—623 (1953). — [9] Guyton, C., and A. McDonald: Physiol. of Botulinus Toxin. Arch. of Neur. **57**, 578—592 (1947). — [10] Heymans, J. F.: Über die Entgiftung von Malonitril. Arch. f. Physiol. 157—158 (1897). — [11] Hyden, H., and H. Hartelius: Stimulation of the Nucleo protein-Production in the Nerve Cells by Malononitril and its effect on Psychic Foundations in Mental Disorders. Acta Psychiatr. (Copenh.) Suppl. **48** (1948). — [12] Koenig, M. P.: Über die Wirkung von Dinitrilen auf die Nervenregeneration. Diss. 1953 u. Helv. physiol. Acta **11**, 329—349 (1953). — [13] Lamanna, C., and McElroy: The purification and cristallisation of Botulinus A Toxin. Science **103**, 613—614 (1946). — [14] Ling, W., and R. W. Gerard: The normal membrane potential of frog sartorius fibres. J. Cellal. a. Comp. Physiol. **166**, 383—396 (1949). — [15] Martini, V., et J. Pattay: Effets des dinitrils malonique et succidique sur la régénération des nerfs de la cornée du lapin. Helv. physiol. Acta 10, C 18—20 (1952).

Dr. Nicolas Gossweiler, Hallerianum Bern, Bern/Schweiz, Bühlplatz 5

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 292—297 (1957)

Aus dem Laboratorium (Leiter: Prof. Dr. Eichler) der Chirurg. Univ. Klinik (Dir.: Prof. K. H. Bauer) Heidelberg

Weitere Untersuchungen über basische Phenoläther

Von

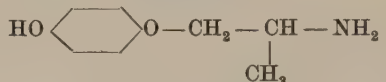
O. Eichler, F. Hertle und **F. Dahm**

Mit 1 Textabbildung

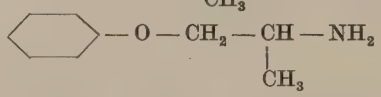
(Eingegangen am 4. Juni 1957)

In einer früheren Arbeit wurde über zwei basische Phenoläther mit sympathicomimetischer Wirkung berichtet*[4]. Es schien uns von Interesse zu wissen, wie sich die entsprechenden nor-Verbindungen verhalten würden. Sie hatten folgende Konstitution**:

C 1925



C 1926



Die Substanzen unterscheiden sich von den früher untersuchten C 1621 und C 1622 dadurch, daß die Methylgruppe am -NH_2 fortgefallen ist, also etwa wie beim Übergang von Adrenalin zu Noradrenalin. Bei dieser Änderung der Konstitution erfolgen aber sowohl quantitative als auch qualitative Differenzen, wenn auch das allgemeine Bild der Sympathicomimetica erhalten bleibt.

Toxicität

C 1925. LD 50 = 550 mg/kg bei s. c. Gabe an Mäuse. Starke Excitation bis zu Krampf sich steigernd. Tachykardie und Tachypnoe, später Seitenlage, Tod in 2—24 Std. Sektion und Histologie: Lungenödem mäßigen Ausmaßes.

C 1926. LD 50 = 180 mg/kg bei s. c. Gabe an Mäuse. Vergiftungsbild wie oben, Exitus schon in ½—2 Std.

Wie bei den N-methylierten Verbindungen ist die Substanz ohne phenolische Hydroxylgruppe giftiger.

---

* Die eine der Substanzen, die sich an der Katze durch besonders langdauernde Wirkung auszeichnete, wurde auch am Menschen von Heinzel u. Hess (Klin. Wschr. 1955. S. 90) geprüft und auch dort, selbst peroral, stark wirksam gefunden. Eine weitere Anwendung war nicht möglich, weil die Verbindung chemisch nicht stabilisiert werden konnte.

** Die Verbindungen wurden uns auf Anforderung durch die Fa. Cilag Schaffhausen hergestellt.

Wirkung an der Katze

Der in der früheren Publikation gegebene Beweis der Sympathicomimese wurde mit derselben Methodik wiederholt. Deshalb können wir die Befunde in kurzen Sätzen niederlegen.

1. Der Blutdruck steigt, der Darm erschlafft, die Milz kontrahiert sich, die Kardiometerkurven werden vergrößert.

2. Der Blutdruckanstieg bleibt nach Dekapitation bestehen. Der Angriffspunkt ist also nicht im Vasomotorenzentrum zu suchen.

3. Auch Pendiomid führt zu keiner Aufhebung der Blutdrucksteigerung. Das schließt die Ganglien als Angriffspunkt aus. Die Milzkontraktion wird etwas schwächer.

4. Nach Hydergin findet sich eine Umkehr der Wirkung, allerdings weniger nachhaltig als bei Adrenalin.

Der Blutdruckanstieg wurde mit Adrenalin verglichen. Die folgenden Werte berücksichtigen nicht die längere Dauer des Anstiegs bei unseren Substanzen.

1 mg C 1925 entsprach in Versuchen an 11 Katzen 5 γ Adrenalin; 1 mg C 1926 entsprach in Versuchen an 12 Katzen 4 γ Adrenalin.

Der Unterschied ist nicht signifikant.

Nach Dekapitation (Versuche an 7 Tieren) entsprach 1 mg beider Verbindungen 9 γ Adrenalin, sie waren also relativ wirksamer.

Auch nach peroraler Gabe war eine Blutdrucksteigerung deutlich, besonders bei C 1926: Dosis 50 mg/kg.

Bei gleicher Wirksamkeit am Blutdruck war C 1926 giftiger. Gegenüber C 1621 und C 1622 war der absolute Blutdruckanstieg (abgesehen von der Dauer) derselbe, obwohl diese Verbindungen weniger toxisch waren. C 1925 wirkte etwas länger als C 1926.

Tachyphylaxie. Auch bei 5 und mehrmaliger Injektion hintereinander wurde dieselbe Blutdrucksteigerung erzielt. Erst allmählich geht die Reaktion zurück. Der Verlauf ist etwa folgendermaßen: die primäre leichte Blutdrucksenkung, die man bei den meisten Adrenalinkörpern findet, nimmt an Ausdehnung zu. Die sekundäre Steigerung bleibt vorerst bestehen, bis beide verschwinden. Die Substanzen können sich untereinander vertreten.

Es kann schon eine völlige Tachyphylaxie gegen Ephedrin, C 1621, oder Veritol eingetreten, sein und doch wirken unsere Verbindungen noch, d. h. die Tachyphylaxie erfolgt deutlich langsamer als die der eben erwähnten Medikamente. Bei Adrenalin und Sympatol verschwindet die Reaktion wiederum langsamer, so daß sich alle Substanzen darin unterscheiden. Die Frage, ob C 1926 oder C 1925 sich darin verschieden verhalten, ist nicht zu beantworten, weil von Tier zu Tier zu große Differenzen auftreten.

Merkwürdig ist, daß die Tachyphylaxie rascher nach Dekapitation eintrat. Wir möchten keine Aussage darüber machen, ob sich die hier gefundenen Differenzen nach ihren physiko-chemischen Eigenschaften mit der These von Horita u. Mitarb.[6] decken, daß die Receptoren „besetzt" werden, so daß neue Dosen nicht mehr wirken können, während die Blutdrucksteigerung durch Gegenregulationen beseitigt wird.

Das Verhalten der *Milzmuskulatur* wurde so registriert, daß der eine Pol befestigt wurde, der andere über einen Schreibhebel seine Bewegungen auf der Rußtrommel aufzeichnete. Wir haben die Ausschläge in Millimeter gemessen und geben die Werte eines Versuchs als Beispiel für C 1926 auf Tab. 1 wieder, auch zur Charakteristik der Tachyphylaxie mit ihrer Abhängigkeit von der Dosis.

Tabelle 1

Zeit	Dosis mg/kg	Drucksteigerung in mm Hg	Milzkontraktionen in mm
14^{25}	1	80	21
14^{45}	2	80	25
15^{04}	3	100	31
15^{40}	4	100	37
16^{14}	5	74	35
16^{40}	6	60	31

10 γ Adrenalin führten bei diesem Versuch zum Blutdruckanstieg von 80 mm. Die Milzkontraktion betrug 30 und 32 mm, am Anfang und Ende der Serie gemessen.

Die periphere Durchblutung

Methodik. Isoliertes Kaninchenohr. Das zu prüfende Mittel wurde in dem Volumen von 0,2 ml in den Schlauch gespritzt.

C 1925 und C 1926 wirkten in der Menge von 0,1 mg gar nicht, in höheren Konzentration bis 1 mg wurde nur ein erhöhter Durchfluß gemessen.

Dieses Bild änderte sich, wenn der Infusionslösung ½% Procain zugefügt wurde. Dann deutete sich eine constrictorische Wirkung an.

Wenn dieser Effekt auch nicht mit Regelmäßigkeit zu beobachten war, schien doch ein Versuch mit anderer Methodik gerechtfertigt, um festzustellen, ob eine der Substanzen als Zusatz zu lokalanaesthetischen Lösungen geeignet wäre.

1. Methodik. Zunächst prüften wir bei der Ratte nach Gyermek[5] die Dauer der anaesthetischen Wirkung von gesetzten Quaddeln einer Novocainlösung mit oder ohne Zusatz unserer Substanzen an symmetrischen Bauchstellen. Während man mit Adrenalinzusatz eine Verlängerung der Anaesthesie nachweisen konnte, gelang das nicht mit C 1925 oder C 1926 in verschiedenen Konzentrationen von 10^{-4} bis $2 \cdot 10^{-3}$, die etwa in dem

Bereich lagen, in dem am isolierten Kaninchenohr eine Wirkung nachweisbar war.

2. Methodik. Sie entspricht einem schon früher verwandten Verfahren[2], bei dem der Abtransport von ^{24}Na aus einem im Gewebe gesetzten Depot nachgewiesen wird. Er ist abhängig von der Durchblutung. Der im Gewebe verbleibende Rest kann bei γ-Strahlen durch ein außen angelegtes Zählrohr nachgewiesen werden. Der Abfall der Aktivität erfolgt exponentiell, ergibt im halblogarithmischen Maßstab eine gerade Linie.

Da die Halbwertszeit von ^{24}Na sehr kurz ist (etwa 14 Std), verwandten wir ^{131}J (8 d), das man einige Zeit vorrätig halten kann. In den früheren Versuchen[2] prüften wir die Resorption von i. m. Depots, hier dagegen subcutane, wie schon bei Versuchen zur Messung der Durchblutung von Rundstiellappen[3]. Als Versuchstiere dienten uns Kaninchen ohne Narkose. Die Bauchhaut wurde sorgfältig rasiert, ein Depot mit 2—5 μC ^{131}J in 0,2—0,4 ml wurde subcutan senkrecht rechts und zum Vergleich gleich weit von der Mittellinie in gleicher Höhe und Tiefe links injiziert. Wir hoben etwas die Bauchhaut an, damit eine Verletzung der Fascie auf jeden Fall vermieden wurde. Daß die zu vergleichen den Lösungen im gleichen Segment injiziert werden, ist wichtig, da nach unseren zahlreichen Versuchen (etwa 100) die verschiedenen Segmente sich stark voneinander unterscheiden können.

Die Lösungen enthielten 0,5 und 1% Novocain und 0,02—0,2% C 1925 und C 1926. Außerdem wurde noch gewöhnliche Kochsalzlösung benutzt. Zur Beurteilung ist entscheidend nur der Verlauf der ersten Minuten.

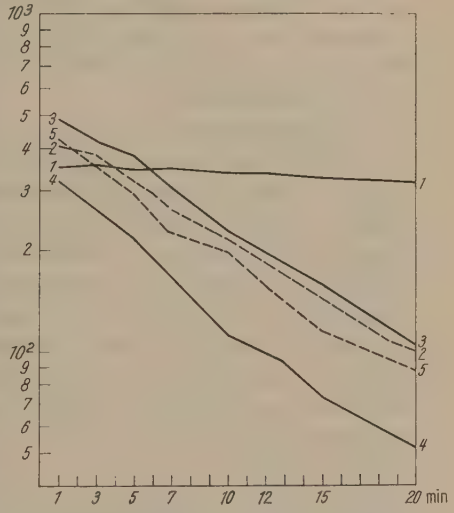


Abb. 1. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: Logarithmus der im Zählrohr gemessenen Impulse/min im logerithmischen Maßstab. *Kurve 1* ½% Novocain + Adrenalin in gebräuchlicher Konzentration $1:2 \cdot 10^{-5}$; *Kurve 2* 0,9% NaCl bei dem gleichen Tier; *Kurve 3* 0,5% Novocain + 0,05% C 1962; *Kurve 4* 0,5% Novocain; *Kurve 5* fast identisch verlaufende Kontrollen zu Kurven 3 u. 4 unter Fortlassen des Novocains

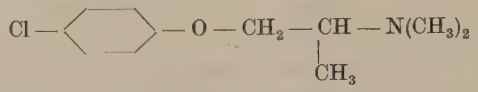
Einige Versuche als Repräsentanten unserer Messungen geben wir auf Abb. 1 wieder.

Nach Zusatz von Novocain findet man keine schnellere Resorption, ebensowenig nach C 1926 oder C 1925. Die überlegene Wirksamkeit des Adrenalins wird deutlich. Selbst nach 1 Std wurden in diesem Versuch noch 300 Impulse/min gezählt. In keinem Versuch bei keiner Konzentration ließ sich eine Gefäßverengerung durch die beiden Phenoläther mit und ohne Novocain nachweisen.

C 1829

Von einer Reihe anderer Substanzen dieser Serie wollen wir nur noch eine wegen ihrer merkwürdigen Wirkung auf den Darm erwähnen.

Die Konstitution ist folgende:



Die *Toxicität*, an Mäusen geprüft, war 310 mg/kg bei s.c. und 180 mg/kg bei i.v. Gabe. Nach kurzen, nicht sehr tiefwirkenden Krämpfen kam es zur Atemlähmung. Die Sektion zeigte ein Lungenödem schwachen Ausmaßes, wie bei allen Substanzen dieser Gruppe.

Die Hauptversuche wurden an 19 Katzen unter Chloralose-Urethan-Narkose ausgeführt (Methode siehe oben).

Der Blutdruck wurde am nicht vorbehandelten Tier bei 1 mg/kg nicht verändert und sank nach höheren Dosen zunehmend ab. Nach der Dekapitation gab es einen flüchtigen Blutdruckanstieg, nach Pendiomid mit Regelmäßigkeit.

Die Kardiometerkurven zeigten häufig bei abnehmendem Blutdruck eine leichte Vergrößerung der Amplituden, sonst eine Abnahme.

Der Darm in situ reagiert nach sympathicomimetischen Substanzen mit Abnahme des Tonus und Aufhören der Peristaltik um so länger, je länger die Substanz wirkt und je höher die Dosis ist. Nur selten schließt sich an diese Lähmung eine Phase vermehrter Aktivität. Wir haben das bei etwa 400 Versuchen, z. B. nach Adrenalin nur 2 mal beobachten können. Unter besonderen Bedingungen[1] gelang es mit Ephedrin, einen rapiden Tonusanstieg hervorzurufen. Es mußte eine partielle Tachyphylaxie (auch gekreuzte war möglich) eingetreten sein.

Mit C 1829 konnte eine Darmlähmung kurzer Dauer erzielt werden (Dosis in diesen Versuchen 3—5 mg/kg), die gelegentlich in eine Phase erhöhter Aktivität übergehen konnte. Wenn der Darm aber primär ohne Bewegung war, konnte man regelmäßig und sofort Kontraktionen hervorrufen. Diese verliefen entweder in Form einer kurzen Tonussteigerung, wie sie von uns schon früher[1] beschrieben und abgebildet wurde, oder eine regelrechte Peristaltik setzte ein und dauerte bis zu 20 min.

Die primäre Darmlähmung haben wir auf verschiedenen Wegen produziert.

1. Operationsschock nach Dekapitation; 2. Veritol 1—2 mg/kg i. v.; 3. Papaverin 1,5 mg/kg i. v.; 4. Atropinsulfat 10—25 mg/kg i. v.; 5. C 1621 5 mg/kg i.v.

Zusammenfassung

2 neue basische sympathicomimetische Substanzen aus der Gruppe der basischen Phenoläther werden beschrieben. Diese Substanzen zeigen nur sehr langsam eine Tachyphylaxie. Eine Veränderung der

Capillarweite, so daß sie etwa als Zusatz zum Lokalanaestheticum verwendbar wären, trat nicht ein. Eine Substanz derselben Reihe wird beschrieben, die eine Darmlähmung zu durchbrechen vermag.

Literatur

[1] Eichler, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 429 (1937). — [2] Eichler, O., F. Linder u. K. Schmeiser: Klin. Wschr. **1949**, 480. — [3] Eichler, O., F. Linder u. K. Schmeiser: Der Chirurg **22**, 340 (1951). — [4] Eichler, O., u. W. Plewa: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 153 (1953). — [5] Gyermek, L.: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 366 (1952). — [6] Horita, A., Th. C. West and T. M. Dille: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 224 (1953).

Prof. Dr. O. Eichler, Chirurgische Univ.-Klinik Heidelberg

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 298—310 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Vergleichende Versuche mit β-Methyl-β-äthylglutarimid, Pentamethylentetrazol und Pikrotoxin am EEG und Blutdruck der Katze*

Von
F. Hahn und A. Oberdorf

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1957)

Eine der wichtigsten Eigenschaften des 1926 von F. Hildebrandt in die Therapie eingeführten Pentamethylentetrazols (Cardiazol, Metrazol) ist seine hohe barbituratantagonistische Wirksamkeit, die zuerst von Hildebrandts Schülern Tartler und Mehl festgestellt und dann auch für den Bereich tödlicher Vergiftungen durch zahlreiche Autoren (Gros u. Hofmann; Koppanyi, Linegar u. Dille; Barlow; Chakravarti; Werner u. Tatum; Booker u. Mitarb.; Einhauser; Fazekas u. Koppanyi) Bestätigung fand. Cardiazol war damit bis vor kurzem das einzige synthetische Analepticum, dessen Anwendung bei den schweren Formen der Barbituratvergiftung auf gesicherter pharmakologischer Grundlage stand. Das nicht synthetische Pikrotoxin hat zwar eine noch höhere Wirksamkeit, aber eine geringere therapeutische Breite. Beide Mittel vermögen zudem infolge etwas verschiedener Lage der Angriffspunkte einander zu ergänzen.

Das 1954 durch Shaw u. Shulman u. Mitarb. eingeführte Methyläthylglutarimid (Megimid, Eukraton) sollte nach einer verbreiteten Auffassung (vgl. Taubmann) als sogenannter „Barbituratantagonist" eine neue Stoffklasse eröffnen, deren Wirkung nicht auf einem funktionellen, sondern auf einem kompetitiven Antagonismus beruhe. Shaw begründete die Sonderstellung des Megimid durch den Hinweis auf eine gewisse chemische Ähnlichkeit mit den Barbituraten, auf die Unwirksamkeit gegenüber anderen Narkotica (Äther, Chloroform) sowie Morphin, auf die hohe barbituratantagonistische Wirksamkeit und auf die Fähigkeit, das EEG bei der Barbituratvergiftung zu restituieren, die anderen Analeptica fehlen soll. Cass hat später noch an Hand des EEG die Spezifität der Megimidwirkung gegenüber Barbituraten im Vergleich

* Herrn Prof. Dr. F. Hildebrandt zum 70. Geburtstag gewidmet.

zu anderen Narkotica (Chloralose, Äther, Methylpentynol) und seine besondere Wirkungsstärke im Vergleich zu anderen Analeptica (Niketh-amid, Cardiazol, Amphetamin, Pikrotoxin) hervorgehoben.

Im Gegensatz hierzu haben wir (Hahn u. Schunk; Hahn, Oberdorf u. Schunk) die Auffassung vertreten, daß das Megimid einen funktionellen Barbituratantagonisten darstellt und in seinen Eigenschaften dem Cardiazol besonders nahesteht, eine Auffassung, die allein schon durch die Krampfgiftnatur des Megimid, durch seine sonstigen Eigenwirkungen (Blutdruck, Temperatur, Atmung) und durch das Vorhandensein eines *reziproken* Antagonismus gegenüber den Barbituraten nahegelegt wird.

Ein Teil der von Shaw u. Cass vorgebrachten Argumente verliert auch schon durch ältere Arbeiten seine Beweiskraft. Eine gewisse Spezifität der Wirkung zeichnet auch das Cardiazol aus, das z. B. auf Chloralose (Hess; Hahn 1948; Driesen, Hahn u. Rummel), Äther (Driesen, Hahn u. Rummel; Biehler; Jackson), Chloroform (Clemente) weniger eindeutig wirkt als auf Barbiturate. Dies gilt speziell auch für die Cardiazolwirkung im EEG (Driesen, Hahn u. Rummel). Man sollte daher auch den Begriff der Spezifität nur zur Kennzeichnung des Wirkungsbereichs, nicht des Wirkungsmechanismus anwenden. Es ist lediglich richtig, daß das Fehlen einer ausreichenden Spezifität einen kompetitiven Antagonismus ausschließt. Aber auch in dieser Hinsicht unterstützen die Befunde nicht den kompetitiven Charakter des Megimid. Es greift ähnlich wie Cardiazol auch auf andere Narkosearten über, wie wir (Hahn, Oberdorf u. Schunk) zuerst am Beispiel des Avertins, Frey, Hushahn u. Soehring sowie Kimura u. Richards auch an anderen Beispielen gezeigt haben.

Von besonderer Bedeutung ist auch die Frage der Wirkungsstärke des Megimid, da kompetitive Antagonisten einen höheren Grad von Wirksamkeit zu besitzen pflegen als funktionelle. Als Maß der Wirkungsstärke kann natürlich nur die Barbituratmenge dienen, die noch durch irgendeine Dosis des Analepticums entgiftet werden kann. Frey, Hushahn u. Soehring haben kürzlich Megimid als doppelt so wirksam wie Cardiazol bezeichnet, dabei aber nur das zur Erzielung eines gleichen Weckeffektes bei nicht tödlichen Narkosen notwendige Dosenverhältnis im Auge gehabt. Aber bei diesem wie auch jedem anderen Dosenverhältnis erlischt die Wirkung des Cardiazol früher als die des Megimid, wenn man zu schwereren Vergiftungsgraden übergeht (Hahn u. Schunk). Es fragt sich nur, ob dieser Unterschied so groß ist, daß daraus Schlüsse auf einen besonderen Wirkungsmechanismus gezogen werden können.

Cass vermißte am EEG barbituratvergifteter Tiere eine restituierende Wirkung des Cardiazol, was aber mühelos seine Erklärung in der zu niedrigen Cardiazoldosierung findet. Er verglich 7,5 mg/kg Cardiazol mit 20 mg/kg Megimid. Driesen, Hahn u. Rummel hatten zur Restituierung der durch Luminal unterdrückten Rindenpotentiale mindestens 50 mg/kg Cardiazol nötig (ähnlich auch Oberdorf mit Luminal und Veronal). Auch Verzeano u. Mitarb. fanden eine antagonistische

Wirkung von Cardiazol gegenüber Barbituraten bei Ableitung der elektrischen Aktivität von Thalamuskernen. Inzwischen haben wir am EEG auch Vergleichsversuche mit Megimid, Cardiazol und Pikrotoxin an Katzen vorgenommen, worüber im folgenden berichtet werden soll. Auch hierzu wählten wir wieder die Veronalvergiftung wie in den oben erwähnten Mäuseversuchen, weil die Vergiftung mit langwirkenden Barbituraten das wichtigste Indikationsgebiet für Analeptica unter den Schlafmittelvergiftungen darstellt.

Erstmalig haben wir bei diesen Versuchen eine laufende Kontrolle des Blutdrucks vorgenommen. Es war bei den schweren Vergiftungsgraden mit einem erheblichen Abfall des Blutdrucks zu rechnen, so daß die Frage besonderes Interesse verdiente, ob die Analeptica in der Lage sind, diese Blutdruckveränderungen wieder auszugleichen, und wie sich das Verhalten des Blutdrucks im EEG widerspiegelt. Man findet in der Literatur (Louw u. Sonne) die eigentümliche Angabe, Megimid steigere im Gegensatz zu anderen Analeptica den Blutdruck nicht. Hahn u. Schunk haben zwar schon bei Katzen in Chloralosenarkose die gleiche Blutdruckwirksamkeit von Megimid und Cardiazol bei Einhaltung des Krampfdosenverhältnisses nachgewiesen. Doch liegen noch keine Versuche, weder für Megimid noch für Cardiazol oder Pikrotoxin, über das Verhalten des Blutdrucks bei schweren Barbituratvergiftungen unter der Anwendung massiver Analepticumdosen vor. Es war bisher lediglich bekannt, daß bei relativ leichter Barbituratnarkose die pressorische Wirkung von Cardiazol stark unterdrückt wird (Hahn, Plester u. Rummel). Darum besitzt die hier angeschnittene Frage auch eine allgemeine Bedeutung im Hinblick auf die Kreislaufreaktionen bei den schweren Barbituratvergiftungen.

Methodik

An 29 Katzen (männlich und weiblich, 1,5—3,2 kg schwer) wurde in leichter Evipannarkose (50—75 mg/kg i.v.) der arterielle Mitteldruck in einer A. femoralis fortlaufend aufgezeichnet (Kondensatormanometer). Nach Freilegen des knöchernen Schädeldachs leiteten wir das EEG mit Schraubenelektroden vom Knochen parietal unipolar gegen die Nasenwurzel ab und registrierten es in wichtigen Versuchsphasen mit einem direktschreibenden Schwarzer-EEG-Gerät[1]. Die Tiere wurden künstlich beatmet und unter Kontrolle der Rectaltemperatur beheizt. Alle Injektionen erfolgten in eine V. femoralis. Veronal (als Natriumsalz) wurde in gestaffelten Dosierungen von 300—1100 mg/kg gegeben. Bei leichteren Vergiftungen (bis 500 mg/kg) wurden mehrere Einzeldosen (je 100 mg/kg; 10%ig in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst) in Abständen von 20—30 min injiziert. Höhere Veronaldosen wurden mit einer Motorspritze innerhalb 2 Std 30 min in einem Volumen von 30 ml infundiert. Die Analeptica, die erstmals etwa 30 min nach Ende der Veronalzufuhr injiziert wurden, waren ebenfalls in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst: Cardiazol 10%ig,

[1] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Geräts.

Megimid und Pikrotoxin je 0,5%ig. Mit Megimid wurden 11, mit Cardiazol 10 und mit Pikrotoxin 8 Versuche durchgeführt.

Die Analeptica wurden fraktioniert alle 10—30 min gegeben. Die Anfangsdosen betrugen 20—25 mg/kg Megimid, 50 mg/kg Cardiazol und 0,5 mg/kg Pikrotoxin. Sie wurden bei den folgenden Injektionen bis zum optimalen therapeutischen Effekt am EEG meist beibehalten, bei späteren Injektionen zur Erzielung von Überdosierungserscheinungen oft erhöht.

Ergebnisse

Die Tabelle faßt alle Versuche zusammen. In ihr sind für die einzelnen Analeptica und die verschiedenen Grade der Veronalvergiftung die zur Erzielung bestimmter EEG-Befunde und Blutdruckveränderungen notwendigen Dosen zusammengestellt.

Das Ausgangsbild war durch die leichte Evipannarkose gegeben und wies eine lebhafte Grundaktivität mit periodischen spindelförmigen Entladungsserien auf. Auf dieses Bild suchten wir das EEG durch die Analeptica nach der Veronalverabreichung wieder zurückzuführen, was je nach der Schwere der Vergiftung und der Art des Analepticum mehr oder weniger vollständig gelang (Spalte II der Tab. 1).

Die Veränderungen durch das Veronal bestanden in Amplitudensenkung der Grundaktivität mit periodischen Unterbrechungen und ab 400—500 mg/kg Veronal in dem Verschwinden der Grundaktivität. Gleichzeitig nahm die Amplitude, Häufigkeit und Frequenz der Spindeln ab, bis auch sie ab 500 mg/kg Veronal verschwanden. Im Bereich von 300—700 mg/kg Veronal traten außerdem isolierte Aktionsströme in unregelmäßiger Folge auf, die mit zunehmender Vergiftung größer und spitzer wurden. Bei höheren Dosen erlosch die elektrische Rindenaktivität. Zeichen einer Spontanremission waren nach Ende der Veronalzufuhr bis zum Beginn der analeptischen Behandlung nicht festzustellen.

Tab. 1 und Abb. 1A—C lassen erkennen, daß bis zu einer Vergiftung mit 500 mg/kg Veronal mit allen 3 Analeptica eine vollständige Reaktivierung möglich ist, wenn ausreichende Dosen gegeben werden, nämlich 20—70 mg/kg Megimid, 50—175 mg/kg Cardiazol und 0,5 bis 2,0 mg/kg Pikrotoxin. Die Veränderungen stellen sich nach Megimid und Cardiazol sofort ein. Die Pikrotoxinwirkung beginnt auch schon sofort, benötigt aber noch einige Zeit bis zum Maximum. Beim Pikrotoxin bereitet es außerdem Schwierigkeiten, das optimale Stadium zu erfassen, weil sich leicht schon Krampfströme einstellen. Die ersten Krampfströme sind durch isolierte schnelle Abläufe mit hoher elektronegativer Amplitude gekennzeichnet. Diese treten z. B. in Abb. 1C nach einem zunächst krampfstromfreien Aktivierungsstadium auf. Wird die Dosierung vorsichtig gewählt, so können sich die Krampfströme wieder zurückbilden und das Bild einer reinen Reaktivierung in Erscheinung treten lassen. Nur einmal trafen wir die richtige Dosis, die ausreichend reaktivierte, ohne daß Krampfströme auftraten.

Bei Megimid und Cardiazol kommt es, wenn über das Optimum hinaus dosiert wird, zunächst zu einem Stadium, in dem die elektrische Aktivität

Tabelle 1. *Wirkung von Megimid, Cardiazol und Pikrotoxin bei der Veronalvergiftung der Katze*

Analepticum	Lfd. Nr.	I			II			III		IV		V		VI	
		Veronal mg/kg	Blutdruck		Therapeutische Wirkung			Beginnende Krampfströme		Erster Krampfanfall		Höchster Blutdruckanstieg		Endwirkung	
			Ausgangswert	Nach Veronal	Dosis/Zeit	Grad der Aktivierung	Blutdruck	Dosis/Zeit	Blutdruck	Dosis/Zeit	Blutdruck	Dosis/Zeit	Blutdruck	Dosis/Zeit	Blutdruck
Megimid	1	300	150	80	(200/0)	KA	110	—	—	200/0	110	200/0	110	400/8	110
	2	400	140	60	25/0	++	120	225/63	110	525/124	80	75/15	135	525/124	80
	3	400	150	90	20/0	++	100	320/60	135	520/89	140	420/76	140	740/103	120
	4	400	120	70	70/16	++	105	320/62	130	—	—	220/45	130	520/91	130
	5	500	120	55	20/0	++	135	220/45	100	—	—	20/0	135	400/74	90
	6	500	140	50	70/15	+	90	670/105	110	1210/200	110	170/30	115	1670/245	95
	7	700	130	60	70/15	+	95	—	—	670/53	80	120/32	110	783/55	80
	8	700	140	45	200/10	++	85	500/40	75	—	—	200/10	85	800/82	55
	9	900	135	35	400/20	+	80	—	—	—	—	300/15	80	400/20	80
	10	1100	120	20	400/30	+	60	—	—	—	—	300/20	65	400/30	60
	11	1100	130	25	400/30	+	55	—	—	—	—	400/30	55	800/87	55
Cardiazol	12	300	130	90	50/0	++	125	450/85	110	650/110	95	50/0	125	650/110	95
	13	400	130	70	50/0	++	70	175/15	75	980/72	65	175/15	80	980/72	60
	14	400	140	120	50/0	++	105	175/15	90	1300/88	100	550/45	110	1300/88	100
	15	500	140	60	175/15	++	70	550/45	60	—	—	50/0	100	1550/93	50
	16	500	160	75	100/15	++	115	400/30	85	1600/60	45	50/0	115	1600/60	45
	17	700	100	60	150/15	+	85	970/36	55	—	—	250/30	90	1970/50	50
	18	900	150	40	250/0	+	70	—	—	—	—	250/0	70	1000/30	40
	19	900	125	45	250/0	+	65	—	—	—	—	250/0	65	1000/30	55
	20	1100	130	20	—	—	—	—	—	—	—	600/10	60	1200/33	30
	21	1100	140	25	—	—	—	—	—	—	—	300/0	110	1200/30	40

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Pikro-	22	400	160	70	0,5/0	++, KS	100	0,5/0	100	—	—	0,5/0	100	0,5/0	100
toxin	23	400	115	60	0,5/0	++, KS	75	0,5/0	75	2,5/60	140	2,5/60	140	2,5/60	140
	24	500	145	55	2,0/30	++, KS	90	0,5/0	65	6,0/90	145	6,0/90	145	6,0/90	145
	25	700	115	60	2,5/65	+, KS	150	1,5/30	95	8,5/105	130	2,5/65	150	18,5/120	105
	26	800	150	60	3,0/90	+, KS	120	2,0/15	100	—	—	3,0/90	120	3,0/90	120
	27	1100	120	25	14,0/110	+, KS	65	2,0/0	50	—	—	14,0/110	115	14,0/110	115
	28	1100	115	40	8,0/0	+, KS	80	8,0/0	80	—	—	8,0/0	80	8,0/0	80
	29	1100	160	40	4,5/90	+, KS	100	1,5/30	55	12,5/145	100	8,5/112	115	16,5/150	100

Dosis/Zeit: mg/kg Analepticum pro Zeit in Minuten. Blutdruck: mm Hg. ++ vollständige Aktivierung. + unvollständige Aktivierung. KS Krampfströme. KA Krampfanfall

wieder abnimmt, am stärksten beim Cardiazol, wo es nach sehr hohen Dosen schließlich zu kurzen Perioden vollkommener elektrischer Ruhe kommen kann (Abb. 1B). Bei noch höheren Dosen treten dann die ersten Krampfströme auf. Die Gesamtdosen, bei denen dies der Fall ist, schwanken allerdings sehr, zum Teil allein schon wegen der ungleichen Zeiten, innerhalb deren diese Dosen gegeben wurden. Sie betragen für Megimid etwa das 2,5—16fache und für Cardiazol das 2—9fache der zur optimalen Aktivierung notwendigen Dosen.

Zum manifesten Krampfstromanfall kam es bei Megimid bei dem 9—26fachen, bei Cardiazol bei dem 13—26fachen und bei Pikrotoxin bei dem 1,7—3,4fachen der Aktivierungsdosis. Megimid und Cardiazol weisen also hinsichtlich der Krampfwirkung etwa die gleiche Sicherheitsbreite auf, während sie bei Pikrotoxin erwartungsgemäß geringer ist. In den Krampfstromanfällen traten allerdings gewisse Unterschiede zwischen Megimid und Cardiazol zutage, denen wir noch besonders nachgehen wollen. Der Krampfstromanfall nach Cardiazol war kompakter, stets von einem generalisierten tonisch-klonischen Krampf begleitet und für einige Zeit von einer vollständigen Hemmung der Rindentätigkeit gefolgt (Abb. 1B). Die Megimidanfälle wurden meist durch kurzdauernde Krampfstromserien eingeleitet, die von lokalisierten Kloni begleitet waren und während deren die Grundaktivität nicht erlosch (Abb. 1A). In anderen Fällen beobachteten wir spike-and-wave-Serien ohne elektronegative Spitzen, die ohne motorische Erscheinungen einhergingen und die nachfolgenden Hirnströme ebenfalls nicht beeinflußten. Die Krampfstromanfälle

nach Pikrotoxin (Abb. 1C) ähnelten mehr den Cardiazolanfällen, waren nur von längerer Dauer.

Das hier Geschilderte erfährt nun im höheren Dosierungsbereich ab 700 mg/kg Veronal Veränderungen infolge der abnehmenden

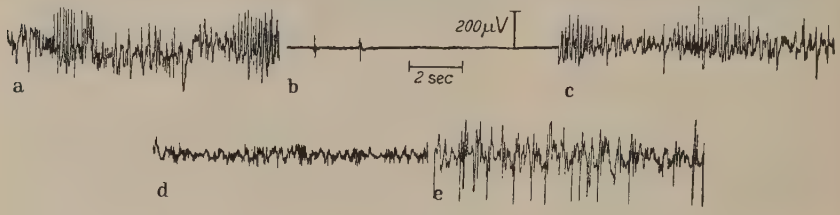


Abb. 1A

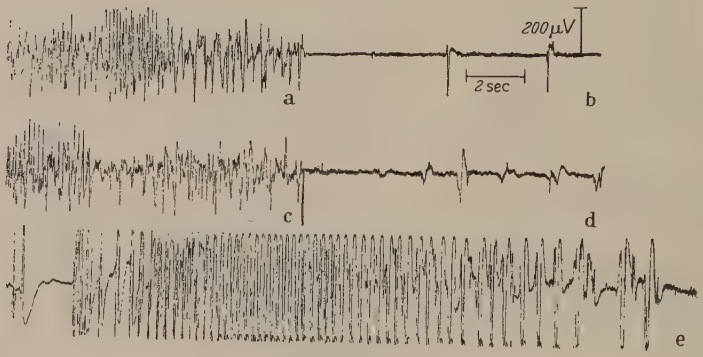


Abb. 1B

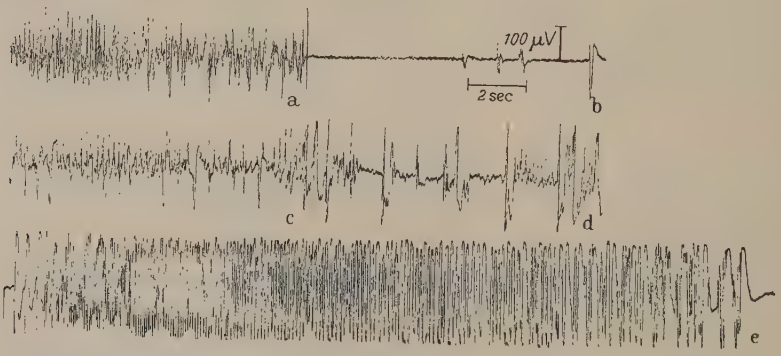


Abb. 1C

Abb. 1. Veronalvergiftung 500 mg/kg. Eingeklammerte Zahlen: Blutdruck in mm Hg
A Megimid: *a* Ausgangsbild (140). *b* Nach Veronal (50). *c* Nach 70 mg/kg Megimid in 15 min (100) optimale Aktivierung. *d* Nach 1070 mg/kg Megimid in 181 min (110) Aktivitätsabnahme. *e* Nach 1570 mg/kg Megimid in 245 min (95) Krampfanfall
B Cardiazol: *a* Ausgangsbild (160). *b* Nach Veronal (75). *c* Nach 100 mg/kg Cardiazol in 15 min (115) optimale Aktivierung. *d* Nach 1600 mg/kg Cardiazol in 60 min (45) Aktivitätsabnahme. *e* Nach 1600 mg/kg Cardiazol in 60 min (35) Krampfanfall
C Pikrotoxin: *a* Ausgangsbild (145). *b* Nach Veronal (55). *c* Nach 2 mg/kg Pikrotoxin in 30 min (65) optimale Aktivierung. *d* Nach 2 mg/kg Pikrotoxin in 30 min (90) Krampfströme. *e* Nach 6 mg/kg Pikrotoxin in 90 min (100) Krampfanfall

Wirksamkeit der Analeptica. Diese Tatsache läßt sich bereits bei 700 mg/kg Veronal für alle 3 Analeptica feststellen. Der Reaktivierungsgrad ist geringer und nimmt auch beim Megimid schneller durch Überdosierung wieder ab. In einem Versuch mit 700 mg/kg Veronal lösten 1970 mg/kg Cardiazol (innerhalb 43 min verabreicht) keine Krämpfe mehr aus, während in einem entsprechenden Versuch dies durch 670 mg/kg Megimid, auf die gleiche Zeit verteilt, noch möglich war. Wir sind der Frage, ob die Cardiazolkrämpfe bei höheren Veronaldosen schneller erlöschen als die Megimidkrämpfe, nicht weiter systematisch nachgegangen, obwohl es auch nach den Mäuseversuchen von Hahn u. Schunk den Anschein hat. Die Pikrotoxinkrämpfe lassen sich immer leicht hervorrufen.

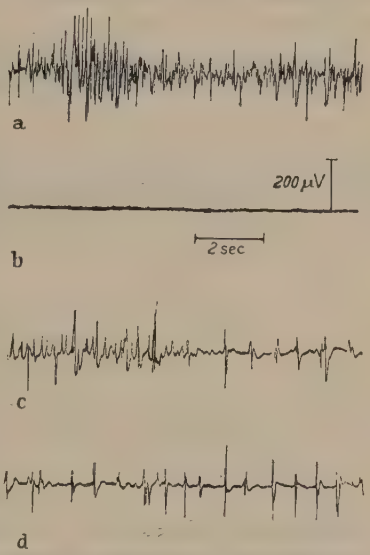


Abb. 2. Cardiazol bei Veronalvergiftung 900 mg/kg. Eingeklammerte Zahlen: Blutdruck in mm Hg. *a* Ausgangsbild (150). *b* Nach Veronal (40). *c* Nach 250 mg/kg Cardiazol (70) optimale Aktivierung. *d* Nach 500 mg/kg Cardiazol in 10 min (60) Aktivitätsabnahme

Bemerkenswert ist nun, daß das Cardiazol auch nach 900 mg/kg Veronal bei hoher Dosierung (250 mg/kg auf einmal verabreicht, Abb. 2 noch eine, allerdings nur partiell reaktivierende Wirksamkeit besitzt. Erst gegenüber 1100 mg/kg Veronal ist es (Abb. 3B) bis zu einer Gesamtdosis von 1200 mg/kg, in 30 min verabreicht, unwirksam. Megimid hingegen besitzt nach 1100 mg/kg Veronal im Dosenbereich von 200 bis 400 mg/kg noch eine Wirkung (Abb. 3A), aber diese ist sehr gering. 4,5 mg/kg Pikrotoxin führen auch noch zu einer gewissen Restitution der Grundaktivität, in die wieder Krampfströme, von lokalisierten oder generalisierten Zuckungen begleitet, eingestreut sind (Abb. 3C).

Es ergibt sich hieraus, daß die Wirkungsgrenze für Cardiazol bei 900 mg/kg Veronal, für Megimid und Pikrotoxin bei 1100 mg/kg Veronal liegt.

Die Reaktivierung im EEG geht mit einer Steigerung des unter Veronal abgefallenen Blutdrucks einher (Tab. 1). Unter Veronal sinkt der Blutdruck in Abhängigkeit von der Höhe der Dosis bis auf 20 mm Hg ab. Der Wiederanstieg unter der Wirkung der Analeptica führt oft nicht mehr zum Ausgangsblutdruck zurück. Die Annäherung war am größten, in einigen Versuchen auch vollständig, nur bei Vergiftungen mit 300 bis

500 mg/kg Veronal. In diesem Bereich wurden mit Megimid die höchsten Werte erreicht. Das Optimum der Blutdrucksteigerung stellte sich meist erst mit höheren Analepticumdosen als den zur hirnelektrischen Reaktivierung nötigen ein (Spalte V der Tab. 1). Bei Megimid und Cardiazol fiel dieses Optimum meist noch in das Stadium vor dem Auftreten der ersten Krampfströme. Mit noch höheren Dosen kommt es zu einem Wiederabfall des Blutdrucks, der mit dem Grade der Überdosierung zunimmt.

Bei den höheren Veronalvergiftungen wurden mit Pikrotoxin die besten Blutdruckanstiege erhalten. Aber auch Cardiazol ergab in einem

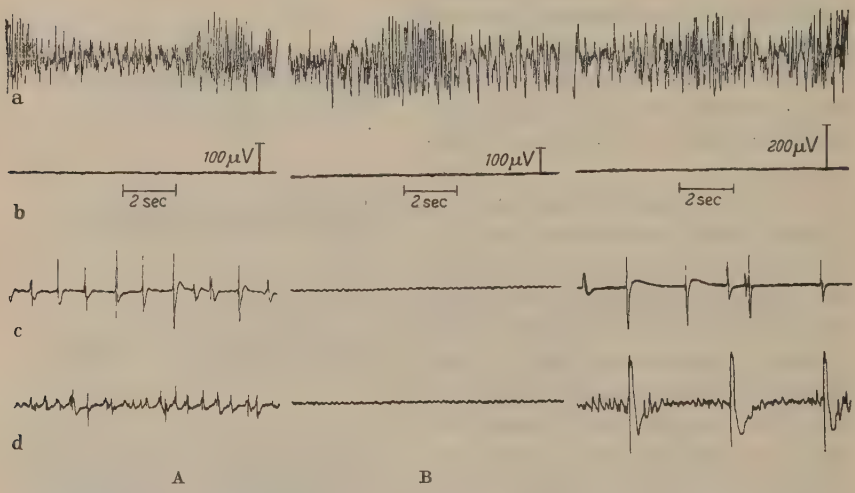


Abb. 3. Veronalvergiftung 1100 mg/kg. Eingeklammerte Zahlen: Blutdruck in mm Hg.
A Megimid: *a* Ausgangsbild (120). *b* Nach Veronal (20). *c* Nach 200 mg/kg Megimid in 10 min (60). *d* Nach 400 mg/kg Megimid in 30 min (60) optimale Aktivierung
B Cardiazol: *a* Ausgangsbild (130). *b* Nach Veronal (20). *c* Nach 600 mg/kg Cardiazol in 10 min (60). *d* Nach 1200 mg/kg Cardiazol in 30 min (30) keine Aktivierung
C Pikrotoxin: *a* Ausgangsbild (160). *b* Nach Veronal (40). *c* Nach 1,5 mg/kg Pikrotoxin in 30 min (55). *d* Nach 4,5 mg/kg Pikrotoxin in 90 min (100) optimale Aktivierung

Versuch trotz fehlender Hirnstomaktivierung noch einen starken Blutdruckanstieg bei einer Vergiftung mit 1100 mg/kg Veronal. Der Blutdruckanstieg unter Pikrotoxin zeigte den schon früher von uns (Hahn) beschriebenen protrahierten Verlauf und ein Optimum bei relativ hohen Dosen, so daß ein Wiederabfall des Blutdrucks wegen vorzeitigen Abbruchs der Pikrotoxinzufuhr meist nicht mehr in Erscheinung trat.

Auch die blutdruckwirksamen Dosen zeigten eine Abhängigkeit von der Schwere der Vergiftung ähnlich wie die hirnstromaktivierenden Dosen. Während z. B. bei Vergiftungen mit 500 mg/kg Veronal 20 mg/kg

Megimid oder 50 mg/kg Cardiazol einen starken Blutdruckanstieg ergaben, waren bei 700 mg/kg Veronal erst 50 mg/kg Megimid oder 100 mg/kg Cardiazol wirksam. Bei Vergiftungen mit 1100 mg/kg Veronal erzielten Einzeldosen von 100—200 mg/kg Megimid und 300 mg/kg Cardiazol einen ausreichenden Anfangseffekt.

Der Wiederabfall des Blutdrucks nach massiver Überdosierung ist bei Cardiazol regelmäßig eingeleitet von starken initialen Senkungen. Diese Senkungen gehen dann wieder bis zu einem neuen, gegenüber dem Ausgang mehr oder weniger erniedrigten Niveau zurück. Megimid zeigte prinzipiell die gleichen Erscheinungen, wenn auch in schwächerem Grade. Diese starken Schwankungen des Blutdrucks in den Stadien der Überdosierung fanden im EEG keinen sichtbaren Ausdruck. Aber der allmähliche und anhaltende Rückgang des Blutdrucks in dieser Phase könnte doch an der gleichzeitig nachweisbaren hirnelektrischen Depression beteiligt sein, zumal Cardiazol beide Erscheinungen in stärkerem Maße zeigte als Megimid.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Befunde sind ein weiterer Beitrag zu der von uns vertretenen Auffassung, daß das Megimid (Eukraton) pharmakologisch zur Cardiazol-Pikrotoxin-Gruppe zu rechnen ist. Die relativ weitgehende Übereinstimmung von Cardiazol und Megimid am EEG und Blutdruck der veronalvergifteten Katze basiert auf der Einhaltung des richtigen Dosenverhältnisses, welches dem Verhältnis der Krampfdosen etwa entspricht. Die Übereinstimmung in der therapeutischen Breite rückt das Megimid mehr in die Nähe des Cardiazol als des Pikrotoxin. Gewisse Unterschiede im elektrischen Erscheinungsbild der Krämpfe, die von uns zwischen Cardiazol und Megimid festgestellt wurden, sind wahrscheinlich nur Hinweise auf Unterschiede in der Lokalisation des Krampfgeschehens, jedenfalls nicht von Bedeutung für Fragen des Wirkungsmechanismus.

Der verzögerte Blutdruckanstieg unter Pikrotoxin hängt mit der bekannten Wirkungslatenz zusammen, zum Teil auch mit der geringen Dosierung in unseren jetzigen Versuchen. Das Dosenverhältnis von Pikrotoxin zu Cardiazol war jetzt durchweg kleiner als das zur Erzielung gleicher Blutdruckeffekte, welches 1:30—35 bei der Katze beträgt (Hahn 1941). Da der Blutdruck nach Durchschreiten der therapeutischen Phase durch Überdosierung wieder abfällt und nicht weiter ansteigt, läßt sich durch diese Versuche die angebliche Gefahr hypertonischer Reaktionen wenigstens für die untersuchten 3 Analeptica experimentell nicht begründen. Den Wiederabfall des Blutdrucks führen wir auf eine Reizung depressorischer Zentren im Hirnstamm zurück (Hahn u. Rummel; Hahn, Plester u. Rummel). Im Hinblick auf den

therapeutischen Wert des Blutdruckanstiegs in der ersten Wirkungsphase der Analeptica ist es von Interesse, daß dieser Effekt bei zunehmender Veronalvergiftung länger erhalten bleibt als die EEG-Aktivierung, wie wir das im Falle des Cardiazol beobachtet haben. Es geht daraus auch hervor, daß der Blutdruckanstieg mindestens nicht die Hauptursache für die EEG-Aktivierung ist, was auch noch durch andere Beobachtungen gestützt wird.

Angesichts der Übereinstimmung in vielen Einzelwirkungen, von denen weitere in kommenden Mitteilungen berücksichtigt werden sollen, kann der Unterschied in der Wirkungsstärke nicht als Beweis für eine qualitative Sonderstellung des Megimid dienen. Dieser Unterschied liegt im hochletalen Veronalbereich (die LD_{50} liegt bei verschiedenen Tierarten zwischen 300 und 400 mg/kg) und ist nicht so groß, wie Shaw sowie Cass es offenbar annehmen, indem sie z. B. von der falschen Voraussetzung ausgehen, daß das Cardiazol in der Barbituratvergiftung keine reaktivierende Wirkung auf das EEG habe. Shaw stützt sich außerdem auf die letalitätssenkende Wirkung des Megimid bei der Barbituratvergiftung, eine Eigenschaft, die aber grundsätzlich auch den beiden anderen Analeptica zukommt.

Die jetzigen Befunde am EEG und Blutdruck spiegeln übrigens gut die Verhältnisse am intakten Tier wieder. Die Grenze der lebensrettenden Wirkung von Cardiazol lag in unseren Mäuseversuchen bei 1000 mg/kg Veronal, einer Dosis, bei der Megimid noch wirksam war (Hahn u. Schunk). Gegenüber 700 mg/kg Veronal zeigte in diesen Versuchen auch Cardiazol eine deutliche letalitätssenkende Wirkung, wenn auch geringer als Megimid. Man muß aber berücksichtigen, daß auch diese Veronaldosis noch über der LD_{50} liegt, während man sicher annehmen darf, daß die klinischen Vergiftungsfälle an der unteren Grenze des Letalitätsbereichs der Veronaldosen liegen (Koppanyi u. Fazekas). In diesem Bereich darf man eine lebensrettende Wirkung von Cardiazol und Pikrotoxin als gegeben ansehen. Nachdem nun das Megimid allenthalben in der Klinik Anerkennung findet, erscheint es — wenigstens von der Pharmakologie her — nicht recht verständlich, warum Cardiazol und Pikrotoxin vorher von manchen so strikte abgelehnt wurden. Die Polypragmasie, die bisher in der Klinik in der Anwendung der Analeptica herrschte, dürfte es schwer machen, ohne neue vergleichende statistische Erhebungen auf diese Frage eine befriedigende Antwort zu geben. Diese Frage erscheint uns von prinzipieller Bedeutung, nachdem sich die Erkenntnis Bahn bricht, daß das Megimid (Eukraton) kein neues Behandlungsprinzip darstellt, sondern einen Fortschritt auf einem Weg, der erstmalig mit der Einführung des Cardiazol durch Hildebrandt erfolgreich beschritten wurde.

Zusammenfassung

1. Nach Vergiftung mit 300—500 mg/kg Veronal gelingt es bei Katzen, die erloschenen Rindenpotentiale mit 20—70 mg/kg β-Methyl-β-äthylglutarimid (Megimid, Eukraton), 50—175 mg/kg Pentamethylentetrazol (Cardiazol, Metrazol) und 0,5—2 mg/kg Pikrotoxin, fraktioniert verabreicht, zu reaktivieren und den Blutdruckabfall wieder zu beseitigen.

2. Die therapeutische Breite von Megimid und Cardiazol ist dabei im Hinblick auf das Auftreten von Krampfströmen und Krampfstromanfällen praktisch gleich, diejenige von Pikrotoxin geringer.

3. Durch Überdosierung von Megimid und Cardiazol kommt es zu einem Wiederabfall des Blutdrucks, der die Krampfphase begleitet und mit der Dosis zunimmt. Bei Pikrotoxin steigt der Blutdruck langsam an und erreicht sein Optimum erst in einem relativ hohen, von Krampfströmen begleiteten Dosenbereich.

4. Ab 700 mg/kg Veronal ist die Wirkung aller 3 Analeptica auf das EEG abgeschwächt. Bei 1100 mg/kg Veronal ist die Cardiazolwirkung erloschen. Megimid zeigt nur noch eine schwache, Pikrotoxin etwa die gleiche, jedoch von Krampfströmen durchsetzte Wirkung.

5. Bei zunehmender Veronalvergiftung nimmt die Blutdruckwirkung der Analeptica trotz zunehmender Dosierung ab, scheint jedoch länger als die hirnelektrische Wirkung zu persistieren.

6. Die Befunde bilden eine Stütze für die Auffassung, daß Megimid zur Cardiazol-Pikrotoxin-Gruppe gehört mit größerer Annäherung an das Cardiazol.

Literatur

Barlow, O. W.: J. Labor. a. Clin. Med. **23**, 601 (1938). — Biehler, W.: „Cardiazol, Pharmakologie und Klinik" Knoll A.G., Chem. Fabriken, Ludwigshafen am Rhein 1951. — Booker, W. M., P. A. Molano, D. M. French and C. Rhodes: J. of Pharmacol. **98**, 207 (1950). — Cass, N. M.: Brit. J. Anaesth. **28**, 325 (1956). — Chakravarti, M.: J. of Pharmacol. **67**, 153 (1939). — Clemente, C.: Diss. München 1927. — Driesen, W., F. Hahn u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 243 (1951). — Einhauser, M.: „Die analeptische Behandlung der schweren Schlafmittelvergiftung in Tierversuch und Klinik", Aulendorf/Württ.: Cantor 1951. — Fazekas, J. F., u. Th. Koppanyi: Current Res. Anesth. a. Analges. **33**, 58 (1954). — Frey, H. H., E. W. Hushahn u. K. Soehring: Arzneimittel-Forsch. **6**, 583 (1956). — Gros, O., u. H. Hofmann: Klin. Wschr. **1936**, 1340. — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **183**, 138 (1936). — Hahn, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 491 (1941); **205**, 572 (1948). — Hahn, F., A. Oberdorf u. R. Schunk: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 1580. — Hahn, F., D. Plester u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 223 (1950). — Hahn, F., u. W. Rummel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 325 (1950). — Hahn, F., u. R. Schunk: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 1643. — Hess, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 204 (1941). — Hildebrandt, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol.

116, 100 (1926). — Jackson, E.: J. Labor. a. Clin. Med. **20**, 1 (1934). — Kimura, E. T., u. R. K. Richards: Arch. internat. Pharmacodynamie **110**, 29 (1957). — Koppanyi, Th., and J. F. Fazekas: Amer. J. Med. Sci. **224**, 577 (1952); **220**, 559 (1950). — Koppanyi, Th., Ch. R. Linegar and J. M. Dille: J. of Pharmacol. **58**, 199 (1936). — Louw, A., and L. M. Sonne: Lancet **1956**, 271, Nov. 10, 961. — Mehl, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **151**, 41 (1930). — Oberdorf, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 182 (1956). — Shaw, F. H.: Med. J. Austral. **1955**, 889. — Shulman, A., F. H. Shaw, N. M. Cass and H. M. Whyte: Brit. Med. J. **1955**, I, 1238. — Tartler, O. P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **143**, 65 (1929). — Taubmann, G.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 416. — Verzeano, M., R. Naquet and E. E. King: J. of Neurophysiol. **18**, 502 (1955). — Werner, H. W., and A. L. Tatum: J. of Pharmacol. **66**, 260 (1939).

Prof. Dr. F. Hahn, Pharmakol. Institut der Medizinischen Akademie, Düsseldorf, Moorenstraße 5

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 311—332 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylase des Gehirns durch Brenzcatechinderivate* **

Von
P. Holtz und E. Westermann

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Für den Abbau der Glutaminsäure, die für den gesamten Aminosäurenstoffwechsel von besonderer Bedeutung ist, stehen dem Organismus verschiedene Fermente zur Verfügung. Während der Abbau in den großen parenchymatösen Organen — Leber, Niere — und im Muskel hauptsächlich durch eine spezifische Dehydrogenase und durch Transaminasen vorgenommen wird, wobei in beiden Fällen α-Ketoglutarsäure entsteht, findet sich im *Gehirn* eine *l-Glutaminsäure-α-decarboxylase*, die optisch spezifisch l-Glutaminsäure durch CO_2-Abspaltung zu *γ-Aminobuttersäure* abbaut. Roberts u. Frankel wiesen als erste dieses Ferment im Rattengehirn nach.

In Versuchen von Czok u. Lang an Ratten führte die Verfütterung von l-Glutaminsäure zu einer Steigerung der Bewegungsaktivität. d-Glutaminsäure war unwirksam bzw. hemmte sogar die Motilität. 5mal wirksamer als l-Glutaminsäure war γ-Aminobuttersäure. Damit wird wahrscheinlich, daß l-Glutaminsäure selbst nicht der wirksame Stoff ist, sondern nur insoweit wirksam wird, als aus ihr durch CO_2-Abspaltung γ-Aminobuttersäure entsteht. Es wird dann verständlich, daß d-Glutaminsäure, die von der optisch spezifischen Decarboxylase des Gehirns nicht angegriffen wird, — wohl durch eine kompetitive Hemmung des l-Glutaminsäureabbaus — die Bewegungsaktivität vermindert.

Bei Untersuchungen über das Vorkommen und die Verteilung der *Dopadecarboxylase* im Nervengewebe (Holtz u. Westermann) war uns aufgefallen, daß die in der Warburg-Apparatur manometrisch gemessenen hohen „Leerwerte" der Gehirnextrakte an abgespaltener CO_2 durch

---

* Vgl. die kurze Mitteilung P. Holtz u. E. Westermann: „Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylase des Gehirns durch Adrenochrom". Naturwiss. **43**, 38 (1955).

** Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Dopa deprimiert wurden, so daß die dopahaltigen Ansätze nach Abzug der „Leerwerte" *negative* Werte ergeben hätten. In der vorliegenden Arbeit haben wir die, wie sich später zeigte, auch durch andere Brenzcatechinderivate verursachte Hemmung näher untersucht, vorher uns aber Aufschluß über das Vorkommen und die Verteilung der Glutaminsäuredecarboxylase im Nervengewebe verschafft.

Methodik

1. Herstellung der Fermentpräparate. Gehirn- bzw. Nervengewebe, das meistens von frisch geschlachteten Rindern stammte, wurde mit der doppelten oder dreifachen Gewichtsmenge m/15 Natrium-Phosphatpuffer p_H 6,5 homogenisiert. Die nach 5 min langem Zentrifugieren bei 3000 U/min (im Mittel 900 x g) abgeheberte überstehende Lösung diente als Fermentpräparat („Homogenat").

2. Versuchsansätze. Je 2,5 ml Homogenat wurden in die Reaktionsgefäße der Warburg-Apparatur einpipettiert. Die beiden birnenförmigen Anhänge der Gefäße waren mit 0,3 ml m/15 Na-Phosphatpuffer (p_H 6,5) bzw. 2—4 mg l (+) *Natriumglutaminat* (Merck) bzw. verschiedenen Mengen der untersuchten *Brenzcatechinderivate* oder *Pyridoxal-5-phosphat* — in 0,3 ml Puffer gelöst — beschickt. Die Versuche wurden bei 37°C in reiner N_2-Atmosphäre durchgeführt. Nach erfolgtem Temperaturausgleich wurde der Inhalt der birnenförmigen Ansätze in die im Hauptraum befindliche Fermentlösung eingekippt. Schüttelgeschwindigkeit 60—80 pro Minute. Manometrische Messung des abgespaltenen CO_2. Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse sind Beispiele für mindestens 3 gleichsinnig verlaufene Versuche.

Versuche

1. Glutaminsäuredecarboxylase-Aktivität des Nervengewebes

Bei längerem Schütteln in der Warburg-Apparatur werden aus Gehirnhomogenaten schon ohne Substratzusatz meßbare CO_2-Mengen frei. Diese sind in den glutaminsäurehaltigen Versuchsansätzen deutlich höher und erfahren eine weitere Steigerung, wenn man Pyridoxal-5-phosphat, das Coferment der Aminosäurendecarboxylasen, zusetzt (Abb. 1). Die Aktivierung beträgt etwa 100%. Im Gegensatz zur *Dopadecarboxylase* des Nervengewebes, deren Wirksamkeit am höchsten in den *peripheren* Strukturen — den sympathischen Nerven und Ganglien — ist (Holtz u. Westermann), findet sich die höchste Aktivität der *Glutaminsäuredecarboxylase* in den *zentralen* Anteilen des Nervensystems: im Gehirn und besonders im Kleinhirn (Abb. 2). Wie in der weißen Substanz des Gehirns und Rückenmarks ist auch in der Hypophyse (Neuro- und Adenohypophyse), den sympathischen Nerven und Ganglien (Milznerv, Grenzstrang und Ggl. stellatum) sowie dem Nebennierenmark (NN) und den parasympathischen und motorischen Nerven (Halsvagus und N. phrenicus) keine Glutaminsäuredecarboxylase nachweisbar. Gehirnhomogenate von kleinen Laboratoriumstieren — Ratte, Maus und Meerschweinchen — besitzen pro g Frischgewicht eine höhere Fermentaktivität als Homogenate aus Schweine- und Rindergehirn.

2. *Hemmung der Glutaminsäure-Decarboxylierung durch Brenzcatechinderivate*

Versetzt man ein Gehirnhomogenat mit 1—2 mg l-Dioxyphenylalanin (DOPA), so wird innerhalb der Versuchszeit weniger CO_2 abgespalten als in dem dopa-freien Ansatz. Die durch Dopa verursachte Hemmung ist deutlicher in den mit l-Glutaminsäure inkubierten Homogenaten. Es kommt dann nicht, wie man erwarten sollte, zu einer *zusätzlichen* Decarboxylierung, sondern zu einer Hemmung

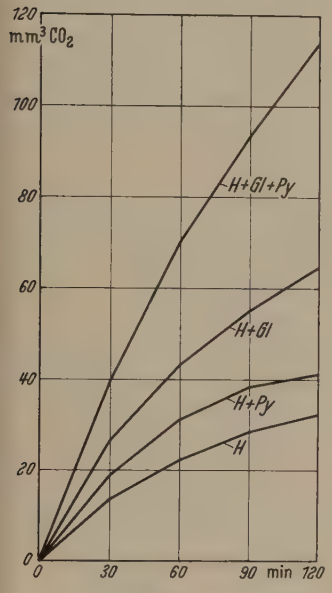


Abb. 1

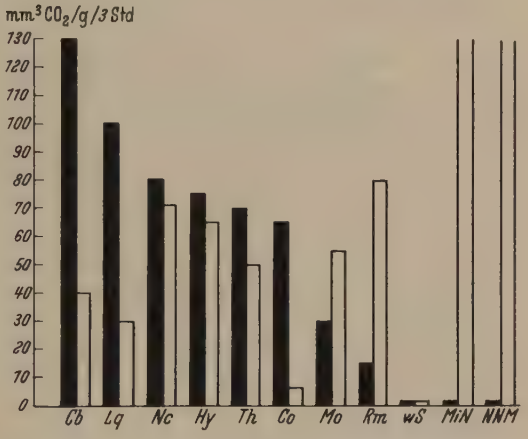


Abb. 2

Abb. 1. *Decarboxylierung von l-Glutaminsäure durch Gehirnhomogenate. Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2, N_2-Atmosphäre, 37° C. *Versuchsansätze: Hauptraum:* 2,5 ml Rindergehirnhomogenat 1 : 3 p_H 6,5. *1. birnenförmiger Anhang:* 0,3 ml m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 bzw. 3 mg l (+) Natriumglutaminat in 0,3 ml Phosphatpuffer p_H 6,5. *2. birnenförmiger Anhang:* 0,2 ml Phosphatpuffer p_H 6,5 bzw. 200 γ Pyridoxal-5-phosphat in 0,2 ml Phosphatpuffer p_H 6,5. *H* Gehirnhomogenat, *Gl* Zusatz von 3 mg l (+) Natriumglutaminat, *Py* Zusatz von 200 γ Pyridoxal-5-phosphat

Abb. 2. *L-Glutaminsäuredecarboxylase- und Dopadecarboxylaseaktivität verschiedener Anteile des Zentralnervensystems (Rind). Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung der in 3 Std abgespaltenen CO_2-Mengen. 3 mg l (+) Natriumglutaminat als Substrat; Zusatz von 200 γ Pyridoxal-5-phosphat. Homogenate aus Rinderorganen: Cerebellum (*Cb*), Lamina quadrigemina (*Lq*), Nucleus caudatus (*Nc*), Hypothalamus (*Hy*), Thalamus (*Th*), Cortex cerebri (*Co*), Medulla oblongata (*Mo*), Rückenmark (*Rm*), weiße Substanz von Großhirn oder Rückenmark (*wS*), Milznerven (*MiN*) und Nebennierenmark (*NNM*). ▬ Glutaminsäuredecarboxylase; ▭ Dopadecarboxylase

der CO_2-Abspaltung. In dem Versuch der Tab. 1 (Vers. Nr. 1a) werden aus dem Gehirnhomogenat in 2 Std 29 mm³ CO_2 abgespalten. Der Zusatz von 2 mg Dopa deprimiert diesen „Leerwert" auf 16 mm³. Im glutaminsäurehaltigen Versuchsansatz werden die innerhalb der Versuchszeit freiwerdenden CO_2-Mengen (63 mm³) durch Dopa auf 26 mm³ vermindert, so daß die dopahaltigen Ansätze nach Abzug des „Leerwertes" negative Werte ergeben. Fügt man den Gehirnhomogenaten 200 γ Pyridoxal-5-phosphat

hinzu (Vers. Nr. 1 b), so wird die jetzt deutlich erhöhte Decarboxylierung der Glutaminsäure durch Dopa nicht mehr gehemmt; in den dopahaltigen Ansätzen kommt es vielmehr zu einer zusätzlichen CO_2-Bildung: die abgespaltene CO_2-Menge entspricht der Summe der aus der Glutaminsäure- und Dopadecarboxylierung stammenden Kohlensäure. Ähnlich wie Dopa hemmt auch sein Decarboxylierungsprodukt *Oxytyramin* (Dopamin) die Decarboxylierung der Glutaminsäure. Zusatz von Pyridoxalphosphat hebt auch diese Hemmung auf (Tab. 1, Vers. Nr. 2a und b). In beiden Fällen dürfte die Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung, die sich durch Zusatz von Coferment verhindern läßt, auf einer Beschlagnahme des im Homogenat ursprünglich vorhandenen Cofermentes beruhen.

Tabelle 1. *Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung durch Dopa und Oxytyramin Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2. *Versuchsansätze:* 2,5 ml Rindergehirnhomogenat 1 : 3 p_H 6,5. D = 2 mg Dopa, Gl = 2 mg l (+) Natriumglutaminat, OT = 2 mg Oxytyramin (Dopamin), Py = 200 γ Pyridoxal-5-phosphat. ( ) = nach Abzug der „Leerwerte"

	mm^3 CO_2 / 120 Min			
Versuch Nr. 1	—	+ D	+ Gl	+ Gl + D
a) Homogenat	29 (0)	16 (—13)	63 (34)	26 (—3)
b) Homogenat + Py . .	34 (0)	108 (74)	98 (64)	170 (136)
Versuch Nr. 2	—	+ OT	+ Gl	+ Gl + OT
a) Homogenat	32 (0)	22 (—10)	64 (32)	35 (3)
b) Homogenat + Py . .	47 (0)	48 (1)	114 (67)	102 (55)

3. Trennung der Glutaminsäuredecarboxylase von der Dopadecarboxylase

Die mit Gehirnhomogenaten schon ohne Substratzusatz erhaltenen Leerwerte an abgespaltenem CO_2 wurden in gleicher Weise wie die durch Zusatz von Glutaminsäure *erhöhten* CO_2-Werte durch Dopa oder Oxytyramin deprimiert (siehe Tab. 1). Auch die in beiden Fällen mögliche Aktivierbarkeit durch Pyridoxalphosphat (siehe Abb. 1 und Tab. 1) sprach dafür, daß die „Leerwerte" durch die Decarboxylierung der schon im Homogenat enthaltenen Glutaminsäure zustande kamen.

Ohne Zusatz von Pyridoxal-5-phosphat ließ sich eine Decarboxylierung von *Dopa* überhaupt nicht nachweisen, da nach Abzug der „Leerwerte" die dopahaltigen Versuchsansätze negative Werte ergeben hätten.

Nach selektiver Abtrennung des Glutaminsäure decarboxylierenden Fermentes dürften deshalb die Gehirnhomogenate keine „Leerwerte" mehr geben und müßten andererseits Dopa auch ohne Zusatz von Pyridoxal-5-phosphat meßbar decarboxylieren. — In früheren Untersuchungen (Holtz u. Credner) hatte sich zeigen lassen, daß in dopadecarboxylase- und *monoaminoxydase*haltigen Nieren- und Leberhomogenaten durch mehrfaches Ausschütteln mit *Kaolin* eine Trennung der beiden

Fermente möglich ist: die nach dem Abzentrifugieren erhaltene fast wasserklare überstehende Lösung enthielt nur noch Decarboxylase. Schüttelt man ein Gehirnhomogenat 3 mal mit Bolus alba[1] (1 g/10 ml), so findet man in der durch Zentrifugieren erhaltenen überstehenden Lösung („Extrakt") nur noch Dopadecarboxylase (Tab. 2): während das unbehandelte „Homogenat" 23 bzw. 54 mm³ CO_2 und nach Zusatz von Glutaminsäure 45 bzw. 115 mm³ CO_2 abspaltet, gibt der „Extrakt" keine „Leerwerte" mehr und decarboxyliert auch zugesetzte Glutaminsäure nicht. Der glutaminsäuredecarboxylasefreie Extrakt ist aber noch in der Lage — genau so gut wie das Homogenat nach Zusatz von Pyridoxal-5-phosphat —, Dopa zu decarboxylieren, und spaltet auch ohne Zusatz von Pyridoxal-5-phosphat nachweisbare CO_2-Mengen aus Dopa ab.

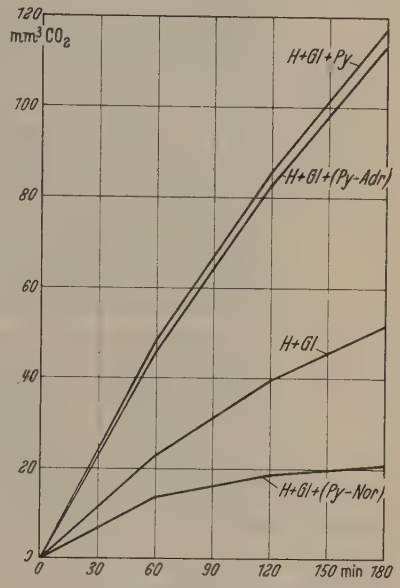


Abb. 3. *Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung durch ein Reaktionsprodukt zwischen Pyridoxal-5-phosphat und Noradrenalin. Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2. 2,0 ml Meerschweinchengehirnhomogenat 1 : 4 p_H 6,5 im Hauptraum. *1. Birne:* 3 mg l (+) Natriumglutaminat in 0,3 ml Na-Phosphatpuffer p_H 6,5. *2. Birne:* 0,3 ml m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 bzw. 200 γ Pyridoxal-5-phosphat in 0,3 ml Puffer gelöst bzw. 200 γ Pyridoxal-5-phosphat + 400 γ Adrenalin oder Noradrenalin in 0,3 ml Puffer (10 min inkubiert). *H* Gehirnhomogenat, *Gl* Glutaminsäure, *Py* Pyridoxal-5-phosphat, *Adr* Adrenalin, *Nor* Noradrenalin

4. Über die Reaktion zwischen Pyridoxal-5-phosphat und Dopa bzw. aromatischen Aminen

Inkubiert man in dem *einen* birnenförmigen Anhang eines Warburg-Gefäßes 0,2 ml einer 1 % igen Lösung (200 γ) von *Pyridoxal-5-phosphat* in m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 mit 0,2 ml einer 2 % igen Lösung (400 γ) von *Dopa, Oxytyramin* oder *Noradrenalin* einige Minuten lang und kippt das Inkubat gleichzeitig mit 2 mg Glutaminsäure in 0,4 ml Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 aus der *anderen* Birne des Reaktionsgefäßes zu dem im Hauptraum befindlichen Gehirnhomogenat, so hat das mit den Brenzcatechinen vorinkubierte Coferment nicht nur seine *aktivierende* Wirkung verloren, vielmehr verursacht das bei der Inkubation entstandene Reaktionsprodukt sogar eine deutliche Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung. — In dem Versuch der Abb. 3 wird die Glutaminsäuredecarboxylase in einem Homogenat aus Meerschweinchengehirn

[1] Bolus alba pulv. subt. DAB. 6

(H + Gl) durch 200 γ Pyridoxal-5-phosphat (H + Gl + Py) um etwas mehr als 100% aktiviert. Demgegenüber hat das mit Noradrenalin vorinkubierte Pyridoxal-5-phosphat nicht nur seine aktivierende Wirkung verloren, sondern hemmt die Glutaminsäuredecarboxylierung (H + Gl + [Py — Nor]): der Kontrollansatz (H + Gl) spaltet innerhalb

Tabelle 2. *Trennung der Dopadecarboxylase von der Glutaminsäuredecarboxylase Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2. *Versuchsansätze:* 2,5 ml Rindergehirnhomogenat 1 : 2,5 p_H 6,5 *(Homogenat)* bzw. 2,5 ml des gleichen Homogenates aus dem durch dreimaliges Schütteln mit Bolus alba (1 g/10 ml) und anschließendes Zentrifugieren ein zellfreier Extrakt gewonnen wurde *(Extrakt)*. Gl = 2 mg l (+) Natriumglutaminat, D = 2 mg Dopa, Py = Zusatz von 100 γ Pyridoxal-5-phosphat. ( ) = Nach Abzug der „Leerwerte"

	mm³ CO_2 / 120 Min					
	—		+ Gl		+ D	
	—	+ Py	—	+ Py	—	+ Py
Homogenat . .	23 (0)	54 (0)	45 (22)	115 (61)	15 (—8)	98 (44)
Extrakt . . .	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	11 (11)	42 (42)

der Versuchszeit (180 min) mehr als 50 mm³ CO_2 ab, das Reaktionsprodukt zwischen Pyridoxal-5-phosphat und Noradrenalin reduziert die Decarboxylierung der Glutaminsäure auf 20 mm³ CO_2 (H + Gl + [Py — Nor]). Vorinkubation mit *Adrenalin* ist ohne Einfluß auf die Wirksamkeit des Cofermentes (H + Gl + [Py — Adr]).

Durch die Inkubation mit Noradrenalin wird aber nicht nur das *Coferment* unwirksam; auch das Amin verliert seine pharmakologische Wirksamkeit. In dem Versuch der Abb. 4 wurden 50 γ Noradrenalin bzw. Adrenalin mit 500 γ Pyridoxal-5-phosphat in 2 ccm $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer p_H 6,5 20 min lang bei 37°C inkubiert und dann nach entsprechender Verdünnung auf ihre blutdrucksteigernde Wirkung an der narkotisierten Katze untersucht: die pressorische Wirkung des Noradrenalins ist durch die Inkubation mit Pyridoxal-5-phosphat praktisch aufgehoben, die des Adrenalins vollständig erhalten geblieben (Abb. 4a). Ein mit dem gleichen Versuchsansatz am isolierten *Meerschweinchenvorhof* durchgeführter Versuch zeigt den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung des *Noradrenalins* (Abb. 4b). Schon nach 8 min langer Inkubation ist seine positiv inotrope Wirkung, die gleich stark wie diejenige des Adrenalins ist, abgeschwächt und nach 12 min fast aufgehoben, während *Adrenalin* selbst nach 16 min langer Inkubation noch vollwirksam ist. Das nur in Puffer (ohne Pyridoxalphosphat) inkubierte Noradrenalin hat seine ursprüngliche Wirksamkeit ebenfalls behalten.

In *Gemischen* von Noradrenalin und Adrenalin läßt sich deshalb durch Inkubation mit Pyridoxal-5-phosphat die Wirkung des Noradrenalins *selektiv* ausschalten (Abb. 5). Im Versuch dieser Abbildung verursachen

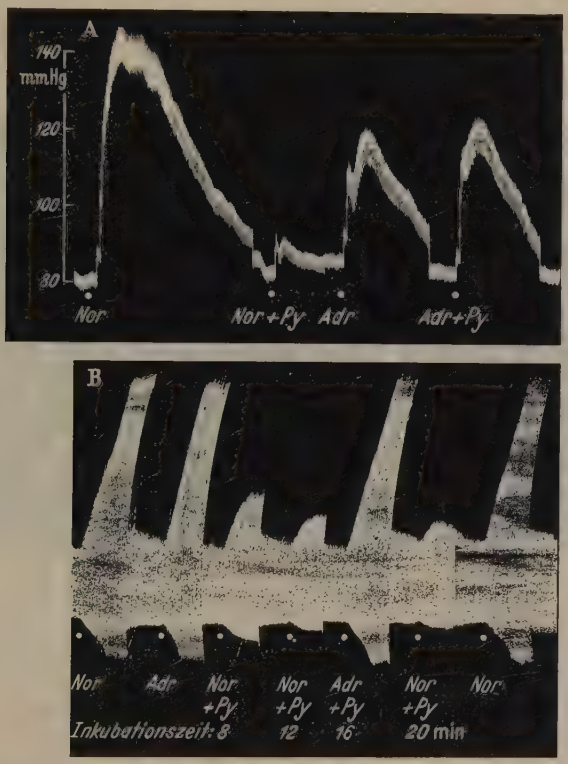


Abb. 4. *Inaktivierung von Noradrenalin durch Inkubation mit Pyridoxal-5-phosphat. A Katze 2,7 kg.* Pernoctonnarkose. 1 mg/kg Pendiomid (N,N,N′,N′,-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-azapentylen(1,5)-diammoniumdichlorid). Blutdruckregistrierung mit Hg-Manometer in der A. femoralis. Injektionen in die V. femoralis. *Versuchsansätze:* 50 γ Noradrenalin bzw. Adrenalin in 1,0 ml Aq. dest. werden mit je 1,0 ml m/15 Na-Phosphatpuffer bzw. mit je 500 γ Pyridoxal-5-phosphat in 1,0 ml m/15 Na-Phosphatpuffer versetzt und bei 37° C 20 min lang inkubiert. Zur Injektion wurden die Ansätze mit Aq. dest. 1 : 10 verdünnt, so daß 5 γ Noradrenalin bzw. Adrenalin in 0,2 ml enthalten waren. *Nor* = 5 γ Noradrenalin, *Adr* = 5 γ Adrenalin, + *Py* = 0,2 ml der Inkubate mit Pyridoxal-5-phosphat (entsprechend 5 γ Noradrenalin bzw. Adrenalin). — *B Isolierter Meerschweinchenvorhof* in 50 ml Tyrode [Methodik siehe Holtz u. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 225, 421 (1955)]. *Versuchsansätze:* wie in *A*. *Nor* = 10 γ Noradrenalin, *Adr* = 10 γ Adrenalin, *Nor* bzw. *Adr* + *Py* = 0,4 ml der Inkubate (entsprechend 10 γ *Nor* bzw. *Adr*)

10 γ Adrenalin (Adr), 10 γ Noradrenalin (Nor) und das aus 5 γ Adr + 5 γ Nor bestehende Gemisch (nach Cocain) eine gleich starke Kontraktion der Nickhaut (1, 2, 3). Inkubiert man ein Gemisch der beiden Brenzcatechine mit Pyridoxal-5-phosphat (4,5), so entspricht sowohl die Blutdruck- als Nickhautwirkung nur noch dem Adrenalingehalt (vgl. 4 mit 9,

sowie 5 mit 1 und 11): Noradrenalin ist bei der Inkubation mit Pyridoxalphosphat vollständig inaktiviert worden (6); die Adrenalinwirkung ist dabei erhalten geblieben (7).

Wie Adrenalin, so werden auch andere Katecholamine, bei denen die NH_2-Gruppe substituiert ist, z. B. Epinin (Dioxyphenyl-methyl-äthylamin) und Aludrin (Dioxyphenyl-isopropyl-äthanolamin) durch Inkubation mit Pyridoxal-5-phosphat nicht inaktiviert und sind auch nicht

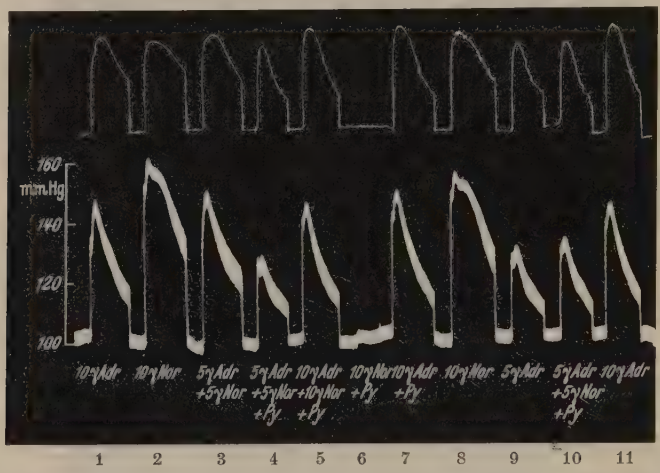
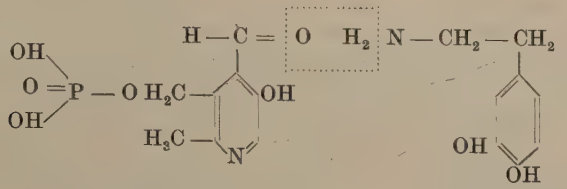


Abb. 5. *Selektive Inaktivierung von Noradrenalin bei Inkubation von Adrenalin-Noradrenalingemischen mit Pyridoxal-5-phosphat. Katze 2,8 kg* Pernoctonnarkose. 2 mg/kg Cocain i. v. Blutdruckregistrierung mit Hg-Manometer in der A. femoralis (untere Kurve), Registrierung der Nickhautkontraktionen (obere Kurve). Injektionen in die V. femoralis. *Versuchsansätze:* 1 mg Noradrenalin + 1 mg Adrenalin in 1 ml Aq. dest. werden mit 0,5 ml m/5 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 bzw. mit 3 mg Pyridoxal-5-phosphat in 0,5 ml m/5 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 versetzt und 20 min lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Zur Injektion wird mit Aq. dest. so verdünnt, daß in 0,4 ml je 10 γ Adrenalin bzw. Noradrenalin enthalten sind

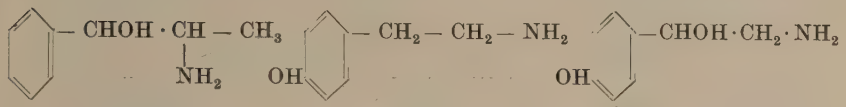
imstande, das Coferment zu inaktivieren. Das ist verständlich, wenn man annimmt, daß die zur gegenseitigen Inaktivierung führende Reaktion zwischen Pyridoxal-5-phosphat und Amin in der Bildung einer Schiffschen Base besteht, wobei nur die freie NH_2-Gruppe der primären Amine — des Oxytyramins und Noradrenalins, auch des Dopa — mit der Carbonylgruppe des Pyridoxal-5-phosphats unter Austritt eines Moleküls H_2O zu reagieren vermag, nicht aber die substituierte NH_2-Gruppe der sekundären Amine Adrenalin, Epinin und Aludrin.

Die Bildung Schiffscher Basen kann aber nicht die einzige Ursache für die beobachteten Inaktivierungen sein, denn *Phenyl-* und *Phenolalkylamine*, z. B. Norephedrin sowie Tyramin und Norsympatol (p-Oxyphenyläthanolamin), müßten als primäre Amine in gleicher Weise wie die primären *Brenzcatechinamine* mit Pyridoxal-5-phosphat Schiffsche Basen bilden können; sie inaktivieren dieses aber nicht und werden auch selbst nicht inaktiviert. Für das Zustandekommen der zu gegenseitiger

Inaktivierung führenden Reaktion ist demnach nicht nur eine freie NH_2-Gruppe in der Seitenkette des aromatischen Amins Voraussetzung, sondern daneben offensichtlich auch das Vorhandensein bestimmter phenolischer *OH-Gruppen.*



Pyridoxal-5-phosphat Oxytyramin



Norephedrin Tyramin Norsympatol

Das wird auch durch Versuche mit dopadecarboxylasehaltigen Nierenextrakten und *Dopa* als Substrat belegt. Aus den in Tab. 3 dargestellten Versuchsergebnissen geht hervor, daß 100 γ Pyridoxal-5-phosphat (Py) im Kontrollansatz die Dopadecarboxylase um mehr als 100% aktivieren: anstatt 70 mm^3 werden in 60 min 171 mm^3 CO_2 abgespalten (1). Inkubation des Cofermentes mit primären *Phenyl-* und *Phenolalkyl*aminen sowie mit *sekundären* Brenzcatechinaminen ist ohne Einfluß (2—9). Dagegen heben die untersuchten *primären* Brenzcatechinderivate mit freier Aminogruppe (10—14), unter ihnen auch Dopa und Dioxyphenylserin, die aktivierende Wirkung des Pyridoxal-5-phosphats nicht nur auf, sondern hemmen sogar wie *Antimetabolite* die normale Decarboxylierung von Dopa, ähnlich wie in dem Versuch der Abb. 3 die Decarboxylierung der *Glutaminsäure* durch das aus Noradrenalin und Pyridoxal-5-phosphat entstandene Reaktionsprodukt unter die „Leerwerte" deprimiert wurde.

Durch diese „Antimetaboliteneigenschaft" des auch aus *Dopa* und Pyridoxal-5-phosphat sich bildenden Reaktionsproduktes findet wohl auch die Beobachtung eine Erklärung, daß der Zusatz großer Cofermentmengen die Decarboxylierung von Dopa nicht fördert, sondern hemmt. So verursachten in dem in Tab. 4 dargestellten Versuch 40 γ Pyridoxal-5-phosphat eine fast 100%ige Aktivierung, die 100fach größere Cofermentmenge (4 mg) hingegen eine fast vollständige Hemmung der Decarboxylierung.

Es entsteht die Frage, wie die phenolischen OH-Gruppen der Brenzcatechine sich an der Reaktion beteiligen. Die Inkubation von Pyridoxalphosphat mit primären Brenzcatechinaminen führt nur dann zu

gegenseitiger Inaktivierung, wenn sie bei annähernd *neutraler* oder leicht *alkalischer* Reaktion, nicht aber, wenn sie bei *saurer* Reaktion (z. B. p_H 5,0) erfolgt.

Tabelle 3. *Reaktionsprodukte zwischen Pyridoxal-5-phosphat und Brenzcatechinderivaten als Hemmstoffe der Dopadecarboxylase*

Warburg-Apparatur: Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2. N_2-Atmosphäre, 37° C. *Versuchsansätze, Hauptraum:* 2,5 ml Meerschweinchennierenextrakt 1 : 20 (m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5). *1. Birne:* 2 mg L-Dopa in 0,4 ml Aq. dest. (als Substrat). *2. Birne:* 0,3 ml Phosphatpuffer p_H 6,5 (Kontrolle) bzw. 100 γ Pyridoxal-5-phosphat in 0,3 ml Puffer p_H 6,5 bzw. 100 Pyridoxal-5-phosphat + 300 γ Amin in 0,3 ml Puffer p_H 6,5. Nach 15 min wird der Inhalt der ersten und zweiten Birne gleichzeitig in den Hauptraum eingekippt. Py = 100 γ Pyridoxal-5-phosphat

Nr.	1. Birne	2. Birne	mm³ CO_2 / 60 min
	Dopa	—	70
1	Dopa	Py	171
2	Dopa	Py + Norephedrin	173
3	Dopa	Py + Tyramin	182
4	Dopa	Py + p-Norsympatol	176
5	Dopa	Py + m-Norsympatol	169
6	Dopa	Py + Tyrosin	170
7	Dopa	Py + Aludrin	165
8	Dopa	Py + Epinin	168
9	Dopa	Py + Adrenalin	165
10	Dopa	Py + Noradrenalin	43
11	Dopa	Py + Oxytyramin	41
12	Dopa	Py + Corbasil	39
13	Dopa	Py + Dopa	39
14	Dopa	Py + Dioxyphenylserin	40

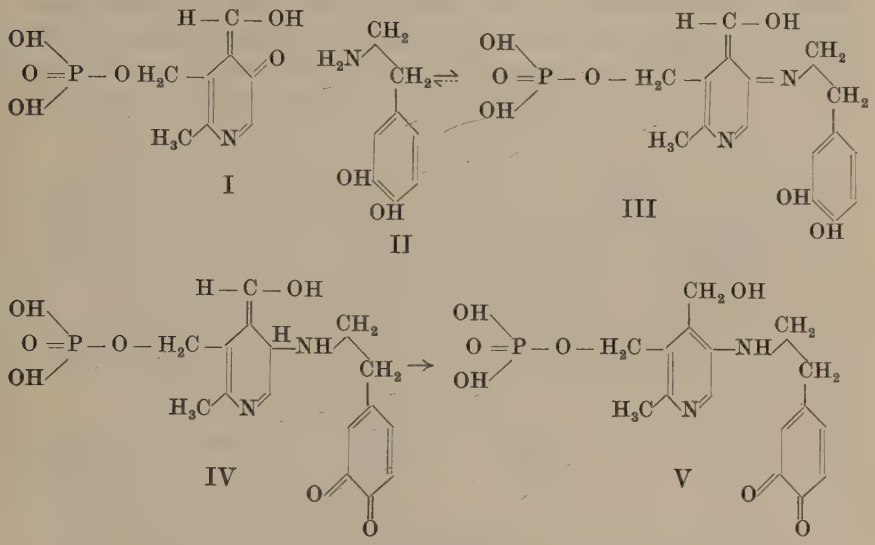
Tabelle 4. *Hemmung der Decarboxylierung von Dopa durch einen Überschuß an Pyridoxal-5-phosphat*

Warburg-Apparatur: Messung der abgespaltenen CO_2, N_2-Atmosphäre, 37° C. *Versuchsansätze:* 2,5 ml Meerschweinchen-Nierenextrakt 1 : 15 p_H 6,5 im *Hauptraum* der Reaktionsgefäße. *1. Birne:* 40 γ bzw. 4 mg Pyridoxal-5-phosphat (Py) in 0,2 ml Aq. dest. *2. Birne:* 2 mg Dopa in 0,3 ml Aq. dest. als Substrat. Die „Leerwerte" sind in Abzug gebracht

mm³ CO_2 / 30 min		
ohne Py	+ 40 Py	+ 4 mg Py
84	155	20

Schon vor der Konstitutionsaufklärung des Pyridoxalphosphats haben Baddiley, Thain u. Rodwell auf Grund der intensiven Gelbfärbung, die auch reinste Präparate in neutraler und alkalischer Lösung zeigten, auf eine *chinoide Struktur* geschlossen. Da der Phosphatrest in 5-Stellung steht, würde dem Coferment

(Pyridoxal-5-phosphat) in neutraler und alkalischer Lösung die Formel I zukommen, in der das für die Bildung der Schiffschen Base notwendige Carbonyl sich in 3-Stellung befindet. Mit *Oxytyramin* oder *Noradrenalin* (Formel II), aber auch mit *Tyramin* könnte sich dann ein Kondensationsprodukt nach Formel III (Schiffsche Base) bilden.



Reaktionsschema 1

Hierbei kommt es zu einer Vertiefung der Gelbfärbung. Während diese in dem tyraminhaltigen Inkubat bestehen bleibt, erfolgt in den oxytyramin- und noradrenalinhaltigen Lösungen nach wenigen Minuten eine Entfärbung.

Die Abb. 6 stellt den elektrophotometrisch gemessenen zeitlichen Verlauf der Farbänderungen dar, die bei der Inkubation von Pyridoxal-5-phosphat mit Tyramin, Noradrenalin und Adrenalin auftreten. Bei der Inkubation mit *Tyramin* nimmt die Extinktion der Pyridoxallösung allmählich zu, erreicht nach 4—5 min ihr Maximum und bleibt dann konstant. Demgegenüber kommt es in dem noradrenalinhaltigen Ansatz nach einer nur kurzdauernden Farbvertiefung zu einer kontinuierlichen Abnahme der Extinktion. Die in beiden Fällen erfolgende Farb*vertiefung* ist wohl durch die mit beiden Aminen mögliche Bildung einer Schiffschen Base bedingt. Diese bleibt im Falle des Tyramins bestehen; das mit Noradrenalin gebildete Kondensationsprodukt erfährt jedoch offensichtlich eine weitere Umlagerung. Diese könnte darin bestehen, daß die C=N-Doppelbindung der Schiffschen Base durch die phenolischen OH-Gruppen hydriert wird, wobei ein ortho-Chinon der Struktur IV entstände; dieses würde sich sofort unter Wiederherstellung der

Pyridinringstruktur in die stabilere Form V umlagern[1] (Reaktionsschema 1).

Dieser Reaktionsablauf würde einmal erklären, warum es in unseren Versuchen nur bei der Einwirkung von *Di*phenolen (Noradrenalin), nicht aber von Monophenolen (Tyramin) auf Pyridoxalphosphat zu einer gegenseitigen Inaktivierung kommt: nur Diphenole können die für die Reduktion der C=N-Doppelbindung erforderlichen beiden Wasserstoffatome

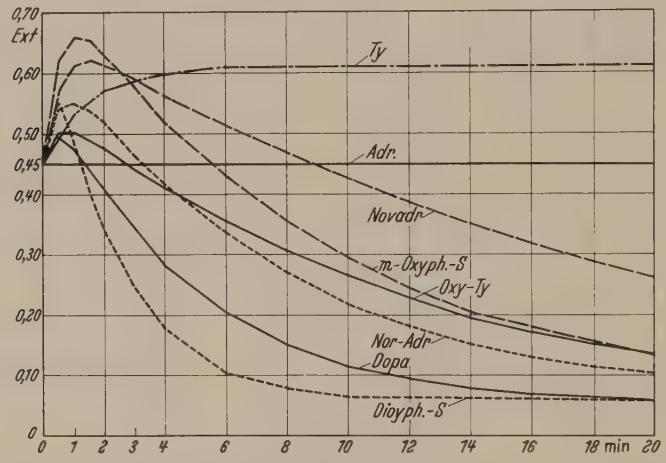


Abb. 6. *Farbänderungen des Pyridoxal-5-phosphats bei der Einwirkung aromatischer Amine und Aminosäuren. Elektrophotometer* (*Elko II*): Zeiss-Opton-Filter S_{42} E_{52}, Cuvette mit 1,003 cm Schichtdicke. Raumtemperatur 22° C. Die Cuvette wird mit 5,0 ml einer 0,0003 molaren Lösung von Pyridoxal-5-phosphat in m/2 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 beschickt (Extinktion 0,45). Dazu werden 0,2 ml einer 0,05 molaren Lösung von Tyramin (*Ty*), Adrenalin (*Adr*), Novadral (*Novadr*), Noradrenalin (*Nor*), Oxytyramin (*Oxy-Ty*), m-Oxyphenylserin (*m-Oxyph.-S*), Dioxyphenylalanin (*Dopa*) oder Dioxyphenylserin (*Dioyph.-S*) pipettiert. Die Extinktion wird alle 30 sec bestimmt

liefern. Ferner würde verständlich, weshalb die Reaktion nur im neutralen bzw. alkalischen p_H-Bereich zustande kommt: Pyridoxal-5-phosphat liegt nur bei neutraler bzw. alkalischer Reaktion in der chinoiden Form vor.

Schließlich würde verständlich, daß Adrenalin, obwohl Diphenol, die Extinktion des Pyridoxal-5-phosphats unverändert läßt, da es als sekundäres Amin (substituierte Aminogruppe) schon zur Primärreaktion — Bildung der Schiffschen Base — nicht fähig ist.

Wenn bei der zu gegenseitiger Inaktivierung führenden Reaktion zwischen Pyridoxal-5-phosphat und primären Brenzcatechinaminen das

[1] Herrn Professor Dr. J. Kühnau in Hamburg danken wir auch an dieser Stelle für seine Beratung bei der Formulierung des hypothetischen, wenn wohl auch prinzipiell möglichen Reaktionsablaufs. — Siehe hierzu auch D. E. Metzler, M. Ikawa and E. E. Snell: „A general mechanism for Vitamin B_6-catalyzed reactions". J. Am. Chem. Soc. **76**, 648 (1954).

hypothetische Reaktionsprodukt IV bzw. V tatsächlich entsteht, wäre zu erwarten, daß dieses nicht mehr durch die Monoaminoxydase angreifbar ist. Versuche mit Meerschweinchenleberhomogenat als Aminoxydasepräparat ergaben, daß die beiden *Brenzcatechinamine* — Oxytyramin und Noradrenalin — nach Vorinkubation mit Pyridoxal-5-phosphat durch das Leberhomogenat praktisch nicht mehr oxydiert wurden, während das

Tabelle 5. *Hemmung der oxydativen Desaminierung primärer Katecholamine durch Vorinkubation mit Pyridoxal-5-phosphat*

Warburg-Apparatur: Manometrische Messung des O_2-Verbrauchs. O_2-Atmosphäre, 37°C. Im *Hauptraum* 2,5 ml Meerschweinchen-Leberhomogenat 1 : 3 p_H 7,4, 0,25 ml m/50 NaCN, 0,25 ml m/10 Semicarbacid. Im *Einsatz* 0,2 ml KOH/NaCN. Im *birnenförmigen Anhang* 2 mg Tyramin, Oxytyramin oder Noradrenalin in 0,2 ml m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5 (Kontrollansätze) bzw. 2 mg der Amine, die mit je 4 mg Pyridoxal-5-phosphat (Py) in 0,2 ml 20 min lang vorinkubiert wurden. Die „Leerwerte" sind in Abzug gebracht

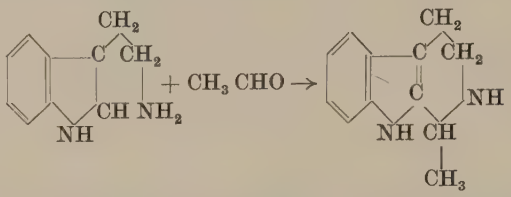
	mm^3 O_2 / 30 min	
	—	+ Py
Tyramin	166	166
Oxytyramin	144	13
Noradrenalin	140	16

nur zur Bildung einer Schiffschen Base befähigte *Phenol*derivat — Tyramin — auch nach der Inkubation durch die Aminoxydase genau so gut oxydiert wurde wie die nicht vorinkubierte Kontrolle (Tab. 5).

Mit dem auf Seite 321 formulierten Reaktionsschema ist nun aber nicht erklärbar, daß auch *Mono*phenolderivate, wenn die OH-gruppe nicht wie beim Tyramin in Para-, sondern in *Meta*stellung seht, z. B. Novadral (m-Oxyphenyl-äthanolamin) und m-Oxyphenylserin, eine zu gegenseitiger Inaktivierung führende Reaktion mit Pyridoxal-5-phosphat eingehen, wozu allerdings eine längere Inkubationszeit erforderlich ist.

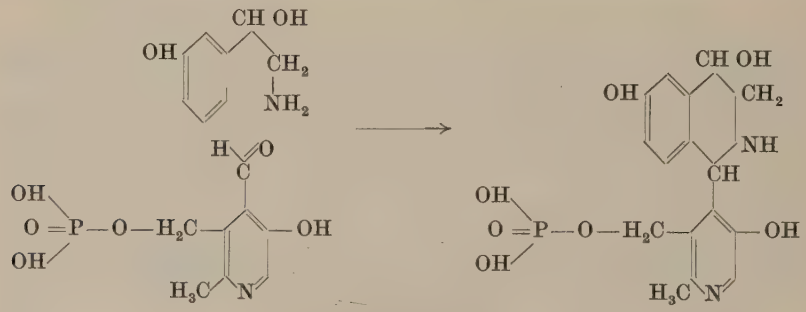
Die Abb. 6 läßt den langsameren Verlauf der Reaktion zwischen diesen beiden Monophenolen (Novadral, m-Oxyphenylserin) und Pyridoxal auch daran erkennen, daß die an eine primäre Zunahme sich anschließende *Abnahme* der Extinktion der Pyridoxallösung verzögert ist. Deshalb ist die primäre Farbvertiefung und Zunahme der Extinktion bei den *Dioxy*-phenylderivaten (Dioxyphenylserin, Dopa, Oxytyramin) nur geringfügig und kurzdauernd, bei den *m-Oxy*-phenylderivaten (m-Oxyphenylserin, Novadral) stärker und länger dauernd. Für die Geschwindigkeit des Reaktionsablaufs scheint aber auch die Konfiguration der Seitenkette von Bedeutung zu sein: so entfärben z. B. die Amino*säuren* (Dopa, Dioxyphenylserin) Pyridoxalphosphat schneller als die entsprechenden *Amine* (Oxytyramin, Noradrenalin).

Vor 20 Jahren berichteten Schoepf u. Bayerle über Kondensationsprodukte zwischen aromatischen Aminen und Aldehyden. Bei der Einwirkung von Acetaldehyd auf Tryptamin kommt es unter Ringschluß der Seitenkette zur Bildung von Tetrahydroharman (Hahn u. Ludewig).



Tryptamin Acetaldehyd Tetrahydroharman

Auf diese Weise erfolgt wahrscheinlich die Synthese der Indolalkaloide in den Pflanzen. Schoepf u. Salzer fanden, daß für die unter Ringschluß der Seitenkette erfolgende Kondensation von *Phenyläthyl*aminen mit Aldehyden zu Tetrahydroisochinolinderivaten eine phenolische OH-Gruppe in *Para*stellung zu dem C-Atom des Benzolringes von Bedeutung ist, an dem es zum Ringschluß der Seitenkette kommt. Das besagt aber, daß die in *Meta*stellung zur Seitenkette befindliche OH-Gruppe entscheidend für das Zustandekommen der Reaktion ist. Die zu gegenseitiger Inaktivierung führende Reaktion zwischen m-Oxyphenylderivaten (m-Oxyphenylserin, Novadral) und Pyridoxalphosphat würde wohl auch zunächst eine Schiffsche Base entstehen lassen (Farbvertiefung), die dann aber unter Hydrierung des Seitenketten-N-Atoms und Ringschluß der Seitenkette in ein Isochinolinderivat überginge (Entfärbung).



Reaktionsschema 2

Nach diesem Reaktionsschema (Formelschema 2) könnten dann nicht nur Dioxyphenyl-, sondern auch Mono-oxyphenylderivate mit Pyridoxalphosphat reagieren, wenn ihre phenolische OH-Gruppe sich in *Meta*stellung befindet. Die in *Para*stellung befindliche OH-Gruppe ist nicht in der Lage, die zu Ringschluß führende Reaktion zu ermöglichen — deshalb erfolgt sie z. B. nicht mit p-Oxyphenyläthylamin (Tyramin) —, beschleunigt sie aber; deshalb reagieren die Brenzcatechinverbindungen, z. B. Dopa, Oxytyramin, Noradrenalin, schneller als die m-Oxyphenylderivate Novadral und m-Oxyphenylserin (siehe Abb. 6). — Das würde im Einklang stehen mit dem von Schott u. Clark erhobenen Befund,

daß bei der Inkubation von „m-Hydroxy-propadrin" (m-Oxyphenyl-propanolamin) und Pyridoxalphosphat ein Tetrahydroisochinolinderivat als Reaktionsprodukt entsteht.

5. *Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung durch Oxydationsprodukte der Brenzcatechinderivate*

Im Gegensatz zu den *primären* Catecholaminen Oxytyramin und Noradrenalin war das *sekundäre* Amin Adrenalin nicht in der Lage, die Glutaminsäuredecarboxylase zu hemmen. Das verschiedene Verhalten fand eine Erklärung darin, daß der zur Hemmung der Fermentwirkung führenden Reaktion zwischen dem Coferment — Pyridoxal-5-phosphat — und den Brenzcatechinderivaten eine Bildung Schiffscher Basen voraufgehen mußte, zu der nur primäre, nicht aber sekundäre Amine fähig waren.

Dieser Befund steht in einem gewissen Gegensatz zu Untersuchungen von Werle über die Hemmung der Dopa- und Histidindecarboxylase. Er fand, daß die beiden decarboxylierenden Fermente nicht nur durch *Dopa* und das primäre Katecholamin *Arterenol*, sondern in gleicher Weise durch das sekundäre Amin *Adrenalin*, ferner durch einfache Polyphenole wie *Brenzcatechin*, Resorcin, Pyrogallol u. a. gehemmt werden, und erklärt diese Hemmung mit der Blockierung einer Haftstelle des zu decarboxylierenden Substrates am Trägerprotein durch eine polare Gruppe des Hemmstoffes, z. B. eine phenolische OH-Gruppe. Der scheinbare Gegensatz zu unseren Ergebnissen dürfte eine Erklärung finden in dem verschiedenen methodischen Vorgehen. Während wir die Brenzcatechinderivate in O_2-freier Atmosphäre bei p_H 6,5 einwirken ließen, wurden diese in den Versuchen von Werle in O_2-haltiger Atmosphäre bei p_H 8,3 30 min lang mit dem Fermentpräparat (Meerschweinchen-Nierenextrakt) vorinkubiert. Da es unter diesen Versuchsbedingungen (O_2, p_H 8,3) zu einer rapiden Oxydation der Polyphenole unter Bildung chinonartiger Verbindungen kommen muß und andererseits bekannt ist, daß Chinone allgemeine Fermentgifte sind, wird verständlich, daß unterschiedslos alle untersuchten Polyphenole hemmten, wenn sie in der hohen Konzentration bis zu 10^{-2} molar zugesetzt wurden.

So finden auch wir, daß Adrenalin, das im Gegensatz zu Noradrenalin und Oxytyramin in N_2-Atmosphäre die Decarboxylierung der l-Glutaminsäure praktisch unbeeinflußt läßt, zu einem starken Hemmstoff wird, wenn man das mit Adrenalin versetzte Gehirnhomogenat vor dem Zukippen der Glutaminsäure 30 min lang in Luftatmosphäre vorschüttelt. Für die Bildung des Hemmstoffes genügt aber eine einfache Oxydation in wäßriger Lösung nicht. Schüttelt man Adrenalin das eine Mal in Phosphatpuffer (p_H 7,4), das andere Mal in Rinder- oder Menschenserum so lange in der Warburg-Apparatur mit Sauerstoff, bis in beiden Lösungen ungefähr 6 Atome pro Molekül aufgenommen worden sind, so übt das in *Serum* oxydierte Adrenalin eine starke Hemmwirkung auf die Decarboxylierung der Glutaminsäure aus, während das in dem wäßrigen *Puffer* oxydierte praktisch ohne Einfluß ist.

Für die Hemmwirkung des Adrenalins ist aber nicht nur das Oxydations*medium* (Pufferlösung oder Serum), sondern auch der Oxydations*grad* von Bedeutung. Der Versuch der Abb. 7 zeigt, daß in Rinderserum oxydiertes Adrenalin die Glutaminsäuredecarboxylase stärker hemmt, wenn man es vorher 6 Atome anstatt nur 2 Atome Sauerstoff pro Molekül aufnehmen läßt. Die gleiche Menge nicht oxydierten, in Stickstoffatmosphäre frisch zugesetzten Adrenalins hat — wie auch im Versuch der Abb. 3 — keine Hemmwirkung.

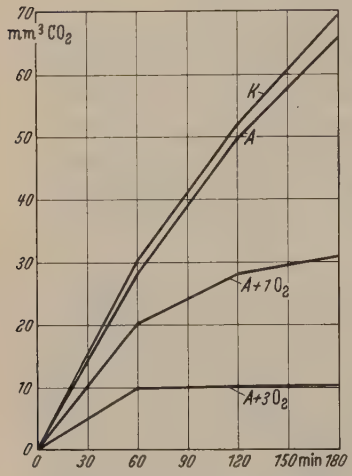


Abb. 7. *Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung durch oxydiertes Adrenalin. Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung des abgespaltenen CO_2. N_2-Atmosphäre, 37° C. *Versuchsansätze:* 2,5 ml Rindergehirnhomogenat 1 : 3 p_H 6,5. *1. Birne:* 3 mg l (+) Natriumglutaminat in 0,3 ml Aq. dest. *2. Birne:* 0,3 ml Rinderserum bzw. in 0,3 ml Rinderserum 250 γ Adrenalin, das vorher 2 bzw. 6 Atome Sauerstoff pro Molekül aufgenommen hatte. *K* Kontrollansatz, *A* Adrenalin (nicht oxydiert), *A* + 1 O_2 = Adrenalin (2 Atome Sauerstoff pro Molekül), *A* + 3 O_2 = Adrenalin (6 Atome Sauerstoff pro Molekül)

Bei der Oxydation von Adrenalin entsteht unter anderem Adrenochrom. Hierzu sind nur 2 Atome Sauerstoff erforderlich. Adrenochrom[1] selbst hat denn auch keine nennenswerte Hemmwirkung auf die Glutaminsäuredecarboxylierung. Schüttelt man eine *Adrenochrom*lösung aber in Serum so lange mit Sauerstoff, bis 4 Atome pro Molekül aufgenommen worden sind, so hemmt diese jetzt die Decarboxylierung der Glutaminsäure ebenso stark wie vorher die *Adrenalin*lösung, die 6 Atome Sauerstoff pro Molekül aufgenommen hatte. Auch hier genügt die Oxydation an sich — Autoxydation in Puffer oder Oxydation durch Polyphenoloxydase — nicht (Abb. 8).

Die von den *oxydierten* Brenzcatechinderivaten ausgeübte Hemmung bleibt auch bei Zusatz von Pyridoxalphosphat bestehen und dürfte deshalb auf einer Hemmung des Apofermentes beruhen (Tab. 6). Sie ist insofern *unspezifisch*, als alle untersuchten Verbindungen wirksam sind. Demgegenüber ließ sich die Hemmwirkung der genuinen, *nicht oxydierten* Katecholamine auf die Dopa- und Glutaminsäuredecarboxylase durch überschüssiges Coferment aufheben und war insofern *spezifisch*, als sie nur durch die primären, zur Bildung Schiffscher Basen fähigen Amine hervorgerufen wurde: durch Noradrenalin und Oxytyramin, nicht aber z. B. durch Adrenalin. Aber auch bei den oxydierten Derivaten bestehen deutliche quantitative Unterschiede. Aus der Abb. 9 ist zu ersehen, daß nach gleichartiger Vorbehandlung —

[1] Den Höchster Farbwerken danken wir für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen.

Tabelle 6. *Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylase durch oxydiertes Adrenalin und Adrenochrom*

Warburg-Apparatur: Manometrische Messung der abgespaltenen CO_2, N_2-Atmosphäre, 37° C. *Versuchsansätze:* Im *Hauptraum* 2,5 ml Rindergehirnhomogenat 1 : 2 p_H 6,5. *1. Birne:* 4,5 mg l (+) Natriumglutaminat in 0,3 ml Aq. dest. *2. Birne:* 0,25 ml Rinderserum (Kontrollansätze) bzw. 100 γ Adrenalin (Adr) oder Adrenochrom (Achr), die vorher in Rinderserum 4 Atome Sauerstoff pro Molekül aufgenommen hatten. ( ) = Prozentuale Hemmung gegenüber den Kontrollwerten. Py = Zusatz von 200 γ Pyridoxal-5-phosphat

	mm^3 CO_2 / 120 min		
	—	+ Adr	+ Achr
Homogenat	75	58 (—23%)	45 (—40%)
Homogenat + Py	159	108 (—32%)	75 (—53%)

Aufnahme von je 4 Atomen Sauerstoff pro Molekül in Serum — Oxytyramin und Arterenol viel schwächer hemmen als Adrenalin und Adrenochrom.

Diskussion

Die Hemmung der Glutaminsäure- und Dopadecarboxylase durch primäre Oxy- und Dioxyphenylalkylamine bzw. -aminosäuren, die eine phenolische OH-Gruppe in Metastellung besitzen, z. B. m-Oxyphenylserin, m-Oxyphenyläthanolamin (Novadral), Dopa, Oxytyramin, Noradrenalin ließ sich durch Pyridoxal-5-phosphat, das Coferment der Decarboxylasen, verhindern. Sie beruht nicht auf einer „kompetitiven" Verdrängung des Substrats am *Apoferment*, sondern, wie sich zeigen ließ, auf einer zur Inaktivierung des *Cofermentes* führenden Reaktion.

Zu den Hemmstoffen gehörte Dopa *selbst* und das unter der Einwirkung von Dopadecarboxylase aus diesem entstehende Oxytyramin. Damit könnte die Reaktion Bedeutung gewinnen im Sinne einer „Selbststeuerung" der Fermentwirkung durch die Höhe des Substratangebotes und die Menge des entstehenden Reaktionsproduktes. Das müßte besonders für solche Fälle zutreffen, in denen, wie bei der *Dopadecarboxylase*, Substrat bzw. Reaktionsprodukt — Dopa und Oxytyramin — leicht und schnell die zur Inaktivierung des Cofermentes führende Reaktion eingehen, weniger aber z. B. für die Decarboxylierung von *5-Oxytryptophan*, das ebenso wie das ihm entsprechende Amin — 5-Oxytryptamin — nur eine geringe „Affinität" zum Coferment (Pyridoxal-5-phosphat) besitzt: in dem Versuch der Abb. 10 kommt deshalb die CO_2-Abspaltung in dem dopahaltigen Ansatz immer wieder nach kurzer Zeit zum Stillstand und durch Zusatz von Coferment wieder in Gang, während sie in dem oxytryptophanhaltigen Ansatz stetig verläuft.

Andererseits eröffnet der in einer Inaktivierung des Cofermentes durch bestimmte Phenol- und Dioxyphenylalkylamine bestehende Mechanismus der Fermenthemmung die Möglichkeit des Übergreifens und Eingreifens auch in andere Fermentreaktionen als diejenigen, an denen die Hemmstoffe selbst — sei es als Substrat, sei es als Reaktionsprodukt — *direkt*

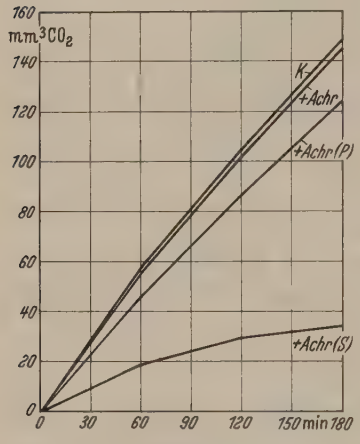


Abb. 8

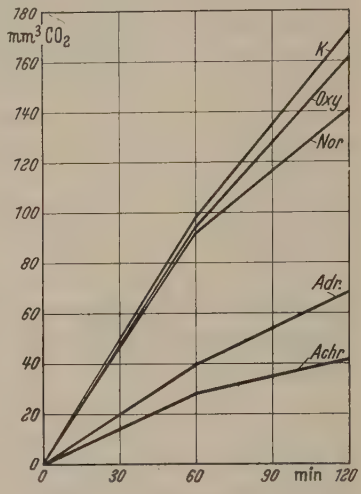


Abb. 9

Abb. 8. *Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung durch oxydiertes Adrenochrom. Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung des abgespaltenen CO_2. N_2-Atmosphäre, 37° C. *Versuchsansätze:* 2,5 ml Rindergehirnhomogenat 1 : 2 p_H 6,5. *1. Birne:* 4 mg l (+) Na-Glutaminat in 0,3 ml Aq. dest. *2. Birne:* 0,3 ml Rinderserum bzw. m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 (Kontrollansätze) bzw. 250 γ Adrenochrom (*Achr*), das in Serum oder Puffer p_H 7,4 vorher 4 Atome Sauerstoff pro Molekül aufgenommen hatte. *S* Oxydation in Serum, *P* Oxydation in Puffer p_H 7,4

Abb. 9. *Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylase durch oxydiertes Oxytyramin, Noradrenalin, Adrenalin und Adrenochrom in Gegenwart von Pyridoxal-5-phosphat. Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung des abgespaltenen CO_2. N_2-Atmosphäre, 37° C. *Versuchsansätze:* 2,5 ml Rindergehirnhomogenat 1 : 2 p_H 6,5. *1. Birne:* 3 mg l (+) Natriumglutaminat + 100 γ Pyridoxal-5-phosphat in 0,3 ml Aq. dest. *2. Birne:* 0,3 ml Rinderserum (Kontrolle) bzw. 200 γ Oxytyramin (*Oxy*), Noradrenalin (*Nor*), Adrenalin (*Adr*) oder Adrenochrom (*Achr*), die vorher 4 Atome Sauerstoff pro Molekül in Rinderserum aufgenommen hatten, in je 0,3 ml Rinderserum

beteiligt sind: nämlich prinzipiell in alle enzymatischen Stoffwechselvorgänge, bei denen Pyridoxal-5-phosphat als Coferment benötigt wird. Hierzu gehören nicht nur, wie unsere Versuche gezeigt haben, der im Gehirn durch Decarboxylierung erfolgende Abbau der *Glutaminsäure* — einer für bestimmte Gehirnfunktionen wichtigen Aminosäure (Übersicht bei Klingmüller) —, sondern die gesamten *Transaminierungs*vorgänge des intermediären Stoffwechsels, für die wiederum die Glutaminsäure von zentraler Bedeutung ist; denn Pyridoxal-5-phosphat ist auch das Coferment der Transaminasen. Schließlich wäre daran zu denken, daß das bei der Reaktion zwischen bestimmten pharmakologisch *wirksamen* aromatischen Aminen — z. B. Oxytyramin, Noradrenalin — und

Pyridoxalphosphat entstehende pharmakologisch *unwirksame* Reaktionsprodukt der *gewebsgebundenen* Form dieser Amine in der Nervensubstanz vielleicht nahesteht. Besonders die *sympathischen* Nerven und Ganglien sind reich an *Dopadecarboxylase* (Holtz u. Westermann), *Oxytyramin* (Schümann) und *Noradrenalin* (v. Euler).

2. Der Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung durch *Oxydationsprodukte* der Brenzcatechinderivate lag ein anderer Mechanismus zugrunde. Diese Fermenthemmung ließ sich durch Zusatz von Coferment nicht aufheben; sie dürfte durch eine Schädigung des *Apofermentes* verursacht sein. Voraussetzung für die Hemmung der Decarboxylase durch genuine — nicht oxydierte — Brenzcatechinabkömmlinge war, daß diese eine primäre, nicht substituierte NH_2-Gruppe besaßen, die mit der Aldehydgruppe des Cofermentes (Pyridoxalphosphat) eine Schiffsche Base bilden konnte. *Noradrenalin* hemmte deshalb, *Adrenalin* nicht. Adrenalin wurde aber zu einem — sogar stärkeren — Hemmstoff als Noradrenalin, wenn man es sich vorher oxydieren ließ.

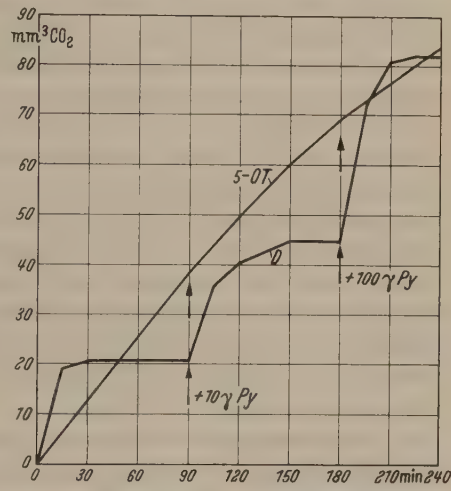


Abb. 10. *Einfluß von Pyridoxal-5-phosphat auf die Dopa- und 5-Oxytryptophandecarboxylierung. Warburg-Apparatur:* Manometrische Messung des abgespaltenen CO_2. N_2-Atmosphäre, 37° C. *Fermentpräparat:* Schweinenieren-Extrakt 1 : 3 in 0,9%iger NaCl-Lösung wurde 5 mal mit je 1 g Bolus alba pro 10 ml geschüttelt und die nach Zentrifugieren gewonnene zellfreie Lösung 24 Std gegen Aq. dest. dialysiert. Das durch Gefriertrocknung erhaltene Pulver diente als decarboxylasehaltiges Fermentpräparat. *Versuchsansätze:* Im *Hauptraum* je 10 mg Fermentpräparat in 0,5 ml m/4 Na-Phosphatpuffer p_H 6,5. *1. Birne:* 2 mg L-Dopa bzw. 5-Oxytryptophan in 0,4 ml Aq. dest. *2. Birne:* 10 γ Pyridoxal-5-phosphat in 0,1 ml Aq. dest. Nach 170 min wurde die Birne erneut mit 100 γ Pyridoxal-5-phosphat in 0,1 ml Aq. dest. beschickt. *Py* Pyridoxal-5-phosphat, *D* Dopa, *5-OT* 5-Oxytryptophan

Die Oxydation kann einmal die Seitenkette betreffen und führt dann zur oxydativen Desaminierung (Aminoxydase); sodann die phenolischen OH-Gruppen des Rings, und führt dann zur Chinonbildung und unter Ringschluß der Seitenkette zur Entstehung eines Indolderivates: *Adrenochrom.* Hierzu sind 2 Atome Sauerstoff pro Molekül erforderlich.

Adrenalin wurde aber erst nach Aufnahme von 4 und 6 Atomen Sauerstoff pro Molekül zum Hemmstoff, wie denn auch Adrenochrom als *solches* die Decarboxylierung der Glutaminsäure *nicht* hemmte, sondern erst dann, wenn es 2—4 Sauerstoffatome pro Molekül aufgenommen hatte. Daraus folgt, daß es ein jenseits der „Oxydationsstufe" des Adrenochroms

liegendes Oxydations- oder Kondensationsprodukt sein muß, dem die Hemmwirkung zukommt. Von besonderer Bedeutung ist, daß die Oxydation *an sich* — in *wäßriger* Lösung — nicht genügt, um aus Adrenalin und Adrenochrom, sowie aus anderen Brenzcatechinderivaten den Hemmstoff entstehen zu lassen, daß hierfür vielmehr die Gegenwart von *Serum* erforderlich ist. Unbefriedigend bleibt, daß die „Diskussion" dieses Teiles unserer Untersuchungen mehr oder weniger nur „deskriptiven" Charakter hat, da es uns in zahlreichen Versuchen, auf die nicht näher eingegangen werden soll, bisher nicht gelang, den auch in das eiweißfreie und fluorescierende Filtrat der Serum-Adrenalininkubate übergehenden und mit organischen Lösungsmitteln ausschüttelbaren Hemmstoff näher zu charakterisieren. Trotzdem verdienen die Ergebnisse unserer Untersuchungen vielleicht Interesse, da Adrenochrom als Oxydationsprodukt des Adrenalins charakteristische *psychische* Wirkungen haben soll (Osmond u. Smythies), die zu seiner Charakterisierung als „Halluzinogen" geführt haben. Besonders bemerkenswert ist deshalb in diesem Zusammenhang der von Taubmann an Patienten der hiesigen Psychiatrischen Klinik erhobene Befund, daß die perlinguale bzw. buccale Resorption von Adrenochrom keine psychischen Wirkungen hat, wohl aber die entsprechende Applikation des längere Zeit gelagerten oder in Serum vorinkubierten Präparates.

3. Die Hemmung des Glutaminsäureabbaus im Gehirngewebe durch biogene Amine und ihre Oxydationsprodukte ist nur ein Beispiel dafür, daß körpereigene Wirkstoffe von charakteristischer *pharmakologischer* Wirksamkeit eine definierte und vielleicht funktionell besonders wichtige *biochemische* Reaktion beeinflussen können.

Nach Untersuchungen von Randall hemmt Adrenochrom die *Glykolyse* des Gehirns; nach Mann u. Quastel wird die Atmung glucosehaltiger Gehirnhomogenate und die Succinatoxydation durch Gehirngewebe von Tyramin und Tryptamin gehemmt, nachdem die Aminoxydase des Gehirns diese Amine zum Aldehyd desaminiert hat. Die zentralen Wirkungen der Rauwolfiaalkaloide, z. B. des Reserpins, versucht man in Beziehung zu bringen zur Freisetzung von 5-Oxytryptamin (Serotonin) im Gehirn. Deshalb kommt der Beeinflussung des Gehirnstoffwechsels durch biogene Amine auch *pharmakologische* Bedeutung zu.

Zusammenfassung

1. Im Gegensatz zur l-Dopadecarboxylase des Nervengewebes, deren Wirksamkeit am höchsten in den sympathischen Nerven und Ganglien ist, findet sich die höchste Aktivität der *l-Glutaminsäuredecarboxylase* in der grauen Substanz der *zentralen* Anteile des Nervensystems: im Gehirn, besonders im Kleinhirn. Die peripheren Strukturen decarboxylieren Glutaminsäure nicht. Pyridoxal-5-phosphat aktiviert die Fermentwirkung um etwa 100%.

2. Die l-Glutaminsäuredecarboxylase läßt sich wie die Monoaminoxydase an Bolus alba adsorbieren; die Dopadecarboxylase nicht. Durch

einfaches Schütteln der Gehirnhomogenate mit Bolus alba ist deshalb eine Trennung der beiden Aminosäurendecarboxylasen möglich.

3. *Primäre Phenylalkylamine* mit einer phenolischen OH-Gruppe in *Meta*stellung — z. B. Oxytyramin, Noradrenalin, m-Oxyphenylserin, auch Dioxyphenylalanin (Dopa) — hemmen die Decarboxylierung der Glutaminsäure, indem sie mit dem Coferment — Pyridoxal-5-phosphat — eine zu gegenseitiger Inaktivierung führende Reaktion eingehen. Die hierbei nach Entstehung Schiffscher Basen wahrscheinlich unter Ringschluß der Seitenkette der aromatischen Amine sich bildenden Reaktionsprodukte — Tetrahydroisochinolinderivate — deprimieren die Decarboxylierung auf Werte, die unter denen der Kontrollansätze liegen. Überschüssig zugesetztes Pyridoxal-5-phosphat hebt die Hemmung auf.

4. *Primäre* Phenylalkylamine, die keine phenolische OH-Gruppe oder nur eine OH-Gruppe in *Para*stellung besitzen — z. B. Norephedrin und p-Oxyphenyläthylamin (Tyramin) —, üben ebenso wie *sekundäre* Amine — z. B. Adrenalin — keine Hemmwirkung auf die Decarboxylierung der Glutaminsäure aus. Im ersten Fall ist offenbar die Kondensation der Seitenkette zu einem Sechserring, im zweiten Fall die zur Bildung Schiffscher Basen führende Primärreaktion nicht möglich. Bei Inkubation mit Pyridoxal-5-phosphat inaktivieren die sekundären Amine dieses als Coferment der Decarboxylasen nicht und werden dabei auch selbst nicht inaktiviert. Die Inkubation von Adrenalin -Noradrenalingemischen mit Pyridoxal-5-phosphat ermöglicht deshalb eine *selektive* Inaktivierung des Noradrenalins als primären Amins.

5. Auch sekundäre Brenzcatechinamine, z. B. *Adrenalin*, ferner *Adrenochrom*, die an sich (in N_2-Atmosphäre) die Decarboxylierung der l-Glutaminsäure nicht beeinflussen, werden zu starken Hemmstoffen, wenn man sie mit dem Gehirnhomogenat oder auch mit Serum in O_2-Gegenwart vorinkubiert. Maximale Hemmungen der Glutaminsäuredecarboxylierung werden erzielt mit *Adrenalin*, das — in Serum gelöst — 6 Atome Sauerstoff und mit *Adrenochrom*, das 4 Atome Sauerstoff pro Molekül aufgenommen hat. Eine entsprechende, in *wäßriger* Lösung, z. B. Phosphatpuffer oder wäßriger Polyphenoloxydaselösung erfolgte Oxydation läßt aus den Brenzcatechinderivaten keine Hemmstoffe entstehen. — Die durch die in Serum oxydierten Brenzcatechinderivate ausgeübte Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylierung unterscheidet sich von der durch die nicht oxydierten, genuinen primären Amine und durch Dopa verursachten Hemmung dadurch, daß sie durch Pyridoxal-5-phosphat nicht aufgehoben wird.

6. Die Versuchsergebnisse werden im Hinblick darauf diskutiert, daß die *Glutaminsäure* eine für den Gehirnstoffwechsel besonders wichtige Aminosäure ist, daß *Adrenochrom* ähnlich wie andere Indolderivate

„halluzinatorische" Wirkungen besitzen soll, und daß die Reaktion zwischen Oxytyramin und Noradrenalin mit Pyridoxal-5-phosphat für die „Selbststeuerung" der Biosynthese der Sympathicusstoffe und für ihre Bindung im Gewebe von Bedeutung sein könnte.

Literatur

Baddiley, J., E. M. Thain u. A. W. Rodwell: Nature (Lond.) **167**, 556 (1951). — Czok, G., u. K. Lang: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 214 (1955). — Euler, U. S. v.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **13**, 1 (1946); J. of Physiol. **105**, 26 (1946). — Hahn, G., u. H. Ludewig: Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 2031 (1934). — Holtz, P., u. K. Credner: Z. physiol. Chem. **262**, 111 (1939). — Holtz, P., u. E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 538 (1956); Naturwissenschaften **42**, 647 (1955). — Klingmüller, V.: Biochemie, Physiologie und Klinik der Glutaminsäure. Arzneimittel-Forsch. 5. Beiheft (1955). — Mann, P. J. G., and J. H. Quastel: Biochemic. J. **34**, 414 (1940). — Osmond, H., and J. Smythies: J. Ment. Sci. **98**, 309 (1952); **99**, 29 (1953). — Randall, L. O.: J. of Biol. Chem. **165**, 733 (1946). — Roberts, E., and S. Frankel: J. of Biol. Chem. **187**, 55 (1950). — Schoepf, C., u. H. Bayerle: Ann. Chem. **513**, 190 (1930). — Schoepf, C., u. W. Salzer: Ann. Chem. **544**, 1 (1940). — Schott, H. F., and W. G. Clark: J. of Biol. Chem. **196**, 449 (1952). — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 566 (1956). — Taubmann, G.: Vortrag: 72. Wanderversammlung südwestdeutscher Neurologen u. Psychiater, Baden-Baden (1956); „Der Nervenarzt" (im Druck). — Werle, E., u. W. Koch: Biochem. Z. **319**, 305 (1948).

Professor Dr. P. Holtz, Pharmakol. Institut d. Univ. Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 333—348 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Beeinflussung der Evipannarkose durch Reserpin, Iproniazid und biogene Amine* **

Von
P. Holtz, H. Balzer, E. Westermann und Eveline Wezler

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Reserpin führt zu einer Freisetzung von *5-Oxytryptamin* (Serotonin) im Gehirn (Brodie u. Mitarb.). In der hypothalamischen Region nimmt auch der *Noradrenalin*gehalt ab (Paasonen u. Vogt; Holzbauer u. Vogt). Es entsteht die Frage, ob ursächliche Beziehungen zwischen bestimmten zentralen Wirkungen des Rauwolfiaalkaloids und der Freisetzung körpereigener biogener Amine bestehen. *Für* das Bestehen eines kausalen Zusammenhanges könnte die Latenz der Reserpinwirkung sprechen; sodann die Tatsache, daß Reserpin kurz nach der Injektion im Gehirn nicht mehr nachweisbar ist, obwohl seine sedative Wirkung, ähnlich wie die Verarmung des Gehirns an Serotonin, tagelang anhält (Brodie u. Mitarb.); ferner die Beobachtung, daß Serotonin in gleicher Weise wie Reserpin den *Barbituratschlaf* verlängert (Shore, Silver u. Brodie).

Es ist anzunehmen, daß die durch Reserpin freigesetzten biogenen Amine durch die *Monoaminoxydase* schnell abgebaut werden. Aufschlußreich erschienen deshalb Versuche, durch Blockierung des Fermentes eine quantitativ erfaßbare Reserpinwirkung — die Verlängerung der Barbituratnarkose — zu beeinflussen. Es ist bekannt, daß *Iproniazid* (Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid; Marsilid) die Monoaminoxydase hemmt (Zeller u. Barsky) und zu einer Verstärkung der Serotoninwirkung — nicht z. B. der Noradrenalin- und Adrenalinwirkung — an der Nickhaut der Katze führt (Balzer u. Holtz).

Versuche

Methodik. Gruppen von je 5—10 weißen Mäusen (17—20 g) erhielten 75 mg/kg *Evipannatrium* (Cyclohexenyl-methyl-N-methylbarbitursaures Natrium) intraperitoneal, ein Teil der Tiere vorher (die Zeiten sind in den Tabellen angegeben)

* Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

** Herrn Prof. Dr. Karl Junkmann zum 60. Geburtstag.

Iproniazid (Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid) der Firma Hoffmann-La Roche, *Reserpin* (Reserpinascorbinat mit 10% Reserpingehalt) der Firma C. F. Boehringer-Mannheim subcutan, bzw. *Serotonin* (5-Oxytryptaminkreatininsulfat) der Firma C. H. Boehringer-Ingelheim, bzw. *Tryptaminhydrochlorid* (Hoffmann-La Roche), *Oxytyraminhydrochlorid* (Hoffmann-La Roche) oder *Tyraminhydrochlorid* intraperitoneal; in anderen Versuchen wurde vor Evipan *Tryptophan* bzw. *5-Oxytryptophan* der Firma Hoffmann-La Roche, *Dopa* (Dioxyphenylalanin), *Dioxyphenylserin (th)*[1] oder *Tyrosin* intravenös injiziert[2].

Die Evipanwirkung galt als abgeklungen, wenn die Tiere sich aus passiver Seitenlage spontan aufrichteten. Da die Narkosedauer nach der gleichen Evipandosis an verschiedenen Tagen sehr verschieden sein konnte, wurden in jeder Versuchsserie Kontrollgruppen angesetzt, die nur *Evipan* bzw. *Iproniazid* + *Evipan* erhielten. Die Beeinflussung der Evipanwirkung durch Reserpin und biogene Amine wurde auf die entsprechenden Kontrollgruppen bezogen und als prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Kontrollen ausgedrückt (Differenz). Die Prüfung der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte (P-Wert) erfolgte mit Hilfe der Standardabweichung.

1. Beeinflussung der Evipannarkose durch Iproniazid

Nach Goldin u. Mitarb., Fouts u. Brodie sowie nach Sturtevant wird die Barbituratnarkose durch Iproniazid verlängert. Aus den in der Tab. 1 dargestellten Versuchen geht hervor, daß das *zeitliche Intervall* zwischen Iproniazid- und Evipaninjektion von ausschlaggebender Bedeutung für die Art der Wirkung ist. Injiziert man Iproniazid 3 Std vor Evipan, so kommt es in Übereinstimmung mit den oben erwähnten Autoren zu einer deutlichen *Verlängerung* der Narkosedauer: im Mittel von 33,6 auf 82,3 min. Injiziert man jedoch die gleiche Dosis 22—44 Std vor Evipan, so wird die Narkosedauer *verkürzt:* im einen Fall von 35,8 auf 18,0 min, im anderen von 36,4 auf 11,2 min. Dem Iproniazid kommen somit zwei verschiedene Wirkungskomponenten zu, von denen die eine — die narkoseverkürzende — die andere — die narkoseverlängernde — offensichtlich überdauert und diese so zu kompensieren vermag, daß es einen Zeitpunkt gibt, zu dem Iproniazid die Evipannarkose überhaupt nicht signifikant beeinflußt. Dieser Zeitpunkt lag in unseren Versuchen bei 18 Std (Tab. 1).

Der narkose*verlängernden* Wirkung des Iproniazids dürfte eine Hemmung des inaktivierenden Abbaus des Barbiturates zugrunde liegen. Fouts u. Brodie fanden, daß 20 min nach Verabfolgung des Narkoticums bei den Tieren, die Iproniazid $^1/_2$ Std vorher erhalten hatten, der Hexobarbitalgehalt des Körpers pro kg fast doppelt so hoch war wie bei den Kontrollen. So wird verständlich, daß die *Avertin*narkose durch Iproniazid, auch wenn man es nur eine Stunde vorher injiziert, *nicht* verlängert, sondern schon etwas verkürzt wird: während die Narkosedauer nach der etwas höheren Evipandosis von 100 mg/kg durch Iproniazid

[1] Herrn Prof. Ehrhart in Höchst danken wir für die Überlassung.

[2] Den erwähnten Firmen danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

um 592% ver*längert* wird, erfährt die *Avertin*wirkung eine Ver*kürzung* um ungefähr 20% (Tab. 2). Injiziert man Iproniazid 18 Std vor Avertin, so nimmt die narkoseverkürzende Wirkung ähnlich wie in den Versuchen mit Evipan deutlich zu (Tab. 2): bei den Normaltieren dauert die Avertinnarkose 60,6 min, bei den Iproniazidtieren nur 25,2 min (— 58,5%).

Tabelle 1. *Beeinflussung der Evipannarkose durch Iproniazid.* Gruppen weißer Mäuse erhielten 75 mg/kg Evipan-Natrium intraperitoneal (*Evipan*); 4 anderen Tiergruppen wurden 3 bis 44 Std vor Evipan 100 mg/kg Iproniazid intramuskulär injiziert (+ *Ipron.*). *Differenz* = Prozentuale Änderung der mittleren Narkosedauer gegenüber den entsprechenden Kontrollen (siehe Methodik)

Std nach Ipron.	Narkosedauer in min			
	Evipan —	Evipan + Ipron.	Differenz %	P-Wert
3	33,6	82,3	+ 145	< 0,05
18	38,0	34,0	— 10	< 0,7
22	35,8	18,0	— 50	< 0,02
44	36,4	11,2	— 69	< 0,01

Tabelle 2. *Beeinflussung der Evipan- und Avertinnarkose durch Iproniazid.* Gruppen weißer Mäuse wurden 100 mg/kg Evipan-Natrium bzw. 300 mg/kg Avertin intraperitoneal injiziert. + *Ipron* = die Tiere erhielten vor dem Narkoticum 100 mg/kg Iproniazid intramuskulär

Std nach Ipron.	Narkoticum	Narkosedauer in min			
		—	+ Ipron	Differenz %	P-Wert
1	Evipan	46,6	318,0	+ 582	< 0,001
1	Avertin	70,0	56,2	— 20	< 0,05
18	Avertin	60,6	25,2	— 58	< 0,02

Es liegt nahe, die narkose*verkürzende* Wirkung des Iproniazids mit einer Hemmung der Monoaminoxydase in Zusammenhang zu bringen. Noch 20 Std nach Injektion von 100 mg/kg Iproniazid ist die Aminoxydase des Gehirns und der Leber bei Ratten und Meerschweinchen vollständig gehemmt (Tab. 3). Die O_2-Aufnahme durch Gehirnhomogenate von Normal- und Iproniazidtieren („Eigenatmung") zeigte keine nennenswerten Unterschiede. Bei *hoher* „Eigenatmung" fand sich regelmäßig — wie auch in dem Versuchsbeispiel der Tab. 3 —, daß der Zusatz von *Tyramin* oder *Serotonin*, der im Gehirnhomogenat der *Normaltiere* zu erhöhtem O_2-Verbrauch führte, im Gehirnhomogenat der *Iproniazidtiere* diesen nicht nur nicht erhöhte, sondern unter die „Leerwerte", d. h. die Werte der „Eigenatmung" *deprimierte*. Das zugesetzte Amin hemmt offensichtlich eine andere, sauerstoffverbrauchende Reaktion des Gehirngewebes. Diese Hemmung des O_2-Verbrauchs wird im Gehirnhomogenat von Normaltieren durch den mit der oxydativen

Desaminierung des Amins verbundenen *Mehrverbrauch* an O_2 überdeckt, tritt aber in Erscheinung, wenn dieser durch Blockierung der Monoaminoxydase unterbunden ist. In dem Versuch der Tab. 3, in dem die Aminoxydaseaktivität bestimmt wurde, enthielten die Versuchsansätze NaCN und Semicarbazid. Aber auch im NaCN-freien Gehirnhomogenat von Iproniazidtieren verursachen die Amine, die wegen Blockierung der

Tabelle 3. *Hemmung der Monoaminoxydase durch Iproniazid. Warburg-Apparatur.* Je 2,0 ml Gehirn- bzw. Leberhomogenat von Ratten in m/15 Na-Phosphatpuffer p_H 7,4 (1 : 5). In allen Reaktionsgefäßen 0,3 ml m/50 NaCN + 0,2 ml m/10 Semicarbazid. *Zusätze:* 0,4 ml Aq. dest. bzw. m/20 Tyraminchlorhydrat (3,5 mg), bzw. m/20 Serotonin (8,2 mg 5-Oxytryptamin-Kreatininsulfat). O_2-Atmosphäre. 37°C. Manometrische Messung des O_2-Verbrauchs. ( ) = nach Abzug der „Leerwerte". *K* = nicht vorbehandelte Kontrolltiere; *I* = die Tiere hatten 20 Std vorher 100 mg/kg Iproniazid intramuskulär erhalten

	Gehirnhomogenat			Leberhomogenat		
	mm^3 O_2/60 min					
	Aq. dest.	Tyramin	Serotonin	Aq. dest.	Tyramin	Serotonin
K	105 (0)	204 (+ 99)	156 (+ 51)	73 (0)	290 (+217)	169 (+ 96)
I	108 (0)	89 (— 19)	70 (— 38)	85 (0)	86 (+ 1)	91 (+ 6)

Aminoxydase selbst nicht oxydiert werden können, die oben beschriebene und in der Tab. 2 zum Ausdruck kommende Depression der „Eigenatmung". Wenn auch über die Natur des Substrats, dessen oxydativer Abbau durch die Amine gehemmt wird, vorläufig nichts ausgesagt werden kann, so muß es sich nach den Versuchen mit NaCN-haltigen und NaCN-freien Ansätzen um eine blausäureunempfindliche, sauerstoffverbrauchende Reaktion handeln.

2. *Beeinflussung der sedativen und narkoseverlängernden Wirkung des Reserpins durch Iproniazid*

Injiziert man Mäusen oder Ratten 10 mg/kg *Reserpin* subcutan, so kommt es nach 1—2 Std zu Ptosis und Abnahme der Spontanmotilität. Verabfolgt man vor der Reserpininjektion 50—100 mg/kg *Iproniazid* intramuskulär, so bleibt die Ptosis nicht nur aus, es kommt vielmehr zu einem Hervortreten der Augäpfel (Exophthalmus), und die Tiere machen eher einen erregten Eindruck (Abb. 1). Über ähnliche Beobachtungen berichteten vor kurzem Besendorf u. Pletscher. Nach einigen Stunden bricht dann allerdings auch bei den „Iproniazidtieren" die Reserpinwirkung durch, obwohl die Aminoxydase noch vollständig blockiert ist.

Wie die sedative Eigenwirkung des Reserpins so wird auch seine die Evipannarkose verlängernde Wirkung durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Iproniazid verhindert. In dem Versuch 1a der Tab. 4 war 2 Std vor Evipan 1 mg/kg Reserpin s. c. injiziert worden. Das führte zu einer Verlängerung der Narkosedauer um 128%. Bei den Mäusen, die 24 Std vor Evipan 100 mg/kg Iproniazid i. m. erhalten hatten, das an

Abb. 1. *Ratten:* 4 Std nach subcutaner Injektion von 10 mg/kg Reserpin (100 mg/kg Reserpinascorbinat). Ratte 2 hatte 2 Std vor Reserpin 100 mg/kg Iproniazid intramuskulär erhalten (s. Text)

sich wiederum zu einer Verkürzung der Narkose führte (von 35,0 auf 24,2 min), war die narkoseverlängernde Wirkung des Reserpins praktisch aufgehoben. Das gleiche Resultat hatte ein Versuch, in dem Iproniazid 20 Std vor Evipan verabfolgt worden war (Tab. 4, Vers. Nr. 3b).

3. Die Wirkung des Serotonins, Tryptamins, Oxytyramins und Tyramins auf die Evipannarkose und ihre Beeinflussung durch Iproniazid

Wie *Reserpin* so verlängert auch *Serotonin* die Evipannarkose, wenn man es 3—5 min vor Evipan intraperitoneal injiziert (Tab. 4, Versuchs-Nr. 1b, 2a, 6a). 50 mg/kg waren nicht wirksamer als 10 und 20 mg/kg. Im Gegensatz aber zu der narkoseverlängernden Wirkung des *Reserpins* wird die *Serotonin*wirkung durch Iproniazid nicht aufgehoben, sondern eher etwas verstärkt, wenn man sie in ein prozentuales Verhältnis zur Narkosedauer bei den nur mit Iproniazid vorbehandelten Kontrollen setzt (Versuchs-Nr. 2a). Während das Indolderivat *Tryptamin* sich wie Serotonin verhält, haben die Brenzcatechin- bzw. Phenolderivate *Oxytyramin* bzw. *Tyramin* keine narkoseverlängernde Wirkung, weder an Normal- noch an „Iproniazidtieren" (Tab. 4, Versuchs-Nr. 2b, c, d; 3a). *Oxytyramin* verursacht eher eine leichte Verkürzung der Narkosedauer. Bei den mit Oxytyramin injizierten „Iproniazidtieren" kam es zu Speichelfluß und Exophthalmus.

Die verschiedene Beeinflussung der narkoseverlängernden Wirkung des *Reserpins* und *Serotonins* durch eine Blockierung der Monoaminoxydase mit Iproniazid — im einen Fall wird sie aufgehoben, im anderen eher verstärkt — scheint dagegen zu sprechen, daß *kausale* Beziehungen

Tabelle 4. *Beeinflussung der Evipannarkose durch Reserpin und biogene Amine* (siehe Methodik). Gruppen von 5—10 weißen Mäusen erhielten 75 mg/kg Evipan-Na i. p. „*Iproniazidtiere*": 18—24 Std vor Evipan 100 mg/kg Iproniazid intramuskulär. *Reserpin:* 2 Std vor Evipan s. c.; *Amine:* 3—5 min vor Evipan i. p.; *Aminosäuren:* 5—8 min vor Evipan i. v.

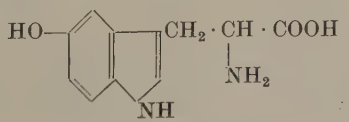
Vorbehandlung				Narkosedauer					
				Kontrolltiere			Iproniazidtiere		
Vers.-Nr.	Std nach Ipron	Dosis mg/kg	Substanz	min	Differenz %	P-Wert	min	Differenz %	P-Wert
1	24	—	—	35,0			24,2		
a		1	Reserpin	79,6	+ 128	< 0,001	26,8	+ 11	< 0,9
b		10	Serotonin	68,5	+ 96	< 0,001	41,5	+ 71	< 0,05
2	22	—	—	43,8			18,6		
a		20	Serotonin	80,0	+ 83	< 0,01	55,6	+ 199	< 0,001
b		20	Tryptamin	70,0	+ 60	< 0,2	69,0	+ 270	< 0,001
c		20	Oxytyramin	38,2	— 13	< 0,4	15,8	— 15	< 0,4
d		20	Tyramin	44,8	+ 2	< 0,7	17,4	— 6	< 0,9
3	20	—	—	48,8			36,8		
a		50	Oxytyramin	33,3	— 32	< 0,2	28,0	— 24	< 0,5
b		1	Reserpin	80,0	+ 64	< 0,02	41,6	+ 13	< 0,8
c		20	Dopa	42,8	— 12	< 0,5	0	— 100	
4	20	—	—	35,4			26,0		
a		15	5-Oxytryptophan	60,2	+ 70	< 0,001	0	— 100	
5	18	—	—	38,0			34,0		
a		20	Tryptophan	85,2	+ 124	< 0,001	10,6	— 69	< 0,01
b		20	Dioxyphenylserin (th)	35,4	— 7	< 0,8	35,2	+ 4	< 0,8
c		20	Tyrosin	42,8	+ 13	< 0,6	42,7	+ 25	< 0,6
6		—	—	59,0					
a		20	Serotonin	112,0	+ 90	< 0,001			
b		2	Reserpin	101,0	+ 71	< 0,001			
c		20	Serotonin						
		+ 2	Reserpin	63,8	+ 7	< 0,6			

zwischen Reserpinwirkung und Freisetzung von Serotonin im Gehirn bestehen. Es muß aber berücksichtigt werden, daß von dem intraperitoneal injizierten gefäßverengernden *Amin* wohl nur kleine Mengen aus dem Blut ins Gehirn übertreten und hier vermutlich zum größten Teil sofort *gebunden* werden, daß Reserpin jedoch gerade das in Bindung

befindliche Serotonin des Gehirns *freisetzt*. Die *Injektion* von Serotonin ist deshalb nicht ohne weiteres mit seiner durch Reserpin verursachten *Freisetzung* im Gehirn vergleichbar: im ersten Fall kommt es allenfalls zu einer Vermehrung *gebundenen*, im zweiten Fall zu einer *Verarmung* an gebundenem und zu einer Zunahme *freien* Serotonins. In beiden Fällen wird die Narkosedauer am *Normaltier* verlängert.

Verhindert man jetzt den Abbau des Serotonins durch Hemmung der Aminoxydase („Iproniazidtiere"), so wirkt sich das nur auf das *freie* Serotonin der unter Reserpinwirkung stehenden Tiere in Form einer Erregung und Narkoseverkürzung aus, nicht aber auf das gebundene Serotonin der mit dem Amin injizierten Tiere, bei denen die narkoseverlängernde Wirkung des Serotonins durch Iproniazid eher verstärkt wird. Daß es das durch Reserpin aus seiner Bindung gelöste *freie* Serotonin ist, das — durch Iproniazid „konserviert" — die sonst narkoseverlängernde Wirkung des Reserpins verhindert, geht sodann auch daraus hervor, daß Serotonin *selbst*, das nach intraperitonealer Injektion bei „*Normaltieren*" die Narkose *verlängert*, das bei „*Reserpintieren*" nicht tut und sogar die narkoseverlängernde Wirkung des Reserpins aufzuheben vermag (Tab. 4, Versuchs-Nr. 6).

Der gleiche Effekt — zentrale Erregung und Narkoseverkürzung durch Vermehrung des freien Serotonins im Gehirn — läßt sich schließlich dadurch erzielen, daß man die pharmakologisch inerte und deshalb leichter als Serotonin die Blut-Gehirnschranke durchdringende Aminosäure 5-Oxytryptophan intravenös injiziert und das aus dieser im Gehirn durch Decarboxylierung entstehende Amin (Serotonin) durch Iproniazid vor dem Abbau schützt. Trotz intakter Bindungs*fähigkeit* des Gehirngewebes für Serotonin wird durch die jetzt erfolgende „Überschwemmung" mit 5-Oxytryptophan bzw. dem aus diesem sich bildenden Serotonin die Bindungs*kapazität* des Gehirns offenbar überschritten. Die resultierende starke Vermehrung des *freien* Serotonins im Gehirn führt dann zu starker Erregung und läßt die Evipannarkose überhaupt nicht zustande kommen (Tab. 4, Versuchs-Nr. 4a). Ohne „Iproniazidschutz" kommt es auch nach der Injektion von 5-Oxytryptophan und Tryptophan nicht zu einem genügend hohen Anstieg des freien Serotonins im Gehirn, um zentrale Erregung und Narkoseverkürzung hervorzurufen. Am „Normaltier" wirken deshalb — wie die *Amine* (Serotonin und Tryptamin) — so auch die injizierten Amino*säuren* narkose*verlängernd* (Tab. 4, Versuchs-Nr. 4a, 5a).



5 — Oxytryptophan

5 — Oxytryptamin (Serotonin)

Besonders bemerkenswert ist, daß die zentralerregende und narkoseverkürzende Wirkung, die nach Injektion der vom *Indol* sich ableitenden Aminosäuren bei Blockierung der Aminoxydase (Iproniazidtiere) auftritt, auch dem vom *Brenzcatechin* sich ableitenden *Dioxyphenylalanin* (Dopa) zukommt, das besonders schnell durch die Dopadecarboxylase zu Oxytyramin wird (Tab. 4, Versuchs-Nr. 3c), — während die narkose*verlängernde* Wirkung am Normaltier ein Reservat der Indolderivate ist (vgl. Tab. 4, Versuchs-Nr. 3c mit 4a, 5a). Daß andererseits die nach der Injektion der Aminosäuren auftretenden Wirkungen, z. B. die narkoseverhindernde Wirkung des Dopa am „Iproniazidtier", nicht durch die Aminosäuren *selbst*, sondern durch die aus ihnen durch Decarboxylierung entstehenden *Amine* verursacht werden, ist auch deshalb wahrscheinlich, weil z. B. *(threo)-Dioxyphenylserin*, das durch Decarboxylierung direkt in Noradrenalin übergehen würde, dessen Decarboxylierung im Nervengewebe aber unvergleichlich langsamer erfolgt als diejenige des Dopa (Holtz u. Westermann), ebenso wie das nur schlecht decarboxylierbare *Tyrosin* auch bei „Iproniazidtieren" ohne Einfluß auf die Evipannarkose ist (Tab. 4, Versuchs-Nr. 5b, c).

4. Die Beeinflussung der Succinatoxydation im Gehirn durch Serotonin

5-Oxytryptophan führte bei Normaltieren zu einer Verlängerung der Evipannarkose, bei „Iproniazidtieren" verhinderte es sie und verursachte Erregungszustände. Im ersten Fall konnte die zum Amin (5-Oxytryptamin; Serotonin) decarboxylierte Aminosäure im Gehirn oxydativ desaminiert werden, im zweiten Fall nicht. Die *Erregungswirkung* scheint demnach dem Amin selbst zuzukommen, die *sedative* Wirkung den Oxydationsprodukten. Zur Objektivierung dieser Annahme haben wir untersucht, ob sich Anhaltspunkte dafür gewinnen lassen, daß Serotonin und seine Oxydationsprodukte sich auf den Abbau eines wichtigen Metaboliten — der Bernsteinsäure — durch Gehirnhomogenate verschieden auswirken.

Die in der Warburg-Apparatur gemessene Sauerstoffaufnahme von Gehirnhomogenaten wird durch Zusatz von Serotonin erhöht, da das Amin durch die im Homogenat vorhandene Monoaminoxydase oxydativ desaminiert wird. Setzt man den Versuch mit Gehirnhomogenaten von Ratten und Meerschweinchen an, die 2—20 Std, bevor sie getötet wurden, 100 mg/kg Iproniazid intramuskulär erhalten hatten, so findet man, daß der Zusatz von Serotonin den O_2-Verbrauch des Gehirnhomogenates nicht mehr erhöht, da das oxydierende Ferment — die Aminoxydase — in vivo durch Iproniazid vollständig blockiert wurde; demgegenüber wird *Bernsteinsäure* in beiden Fällen gleich gut oxydiert (Tab. 5).

Setzt man nun dem Gehirnhomogenat, in dem Serotonin unter erhöhtem O_2-Verbrauch oxydativ desaminiert worden ist (Normaltier),

und demjenigen, in dem das wegen Blockierung der Aminoxydase nicht möglich war („Iproniazidtier"), *Bernsteinsäure* (Natriumsuccinat) zu, so ist die Succinatoxydation in dem „normalen" Homogenat, das vorher Serotonin abgebaut hatte, stark gehemmt, nicht aber oder viel weniger in dem Gehirnhomogenat des „Iproniazidtieres", in dem Serotonin nicht hatte abgebaut werden können (Tab. 5).

Tabelle 5. *Hemmung der Succinatoxydation in Gehirnhomogenaten durch Oxydationsprodukte des Serotonins. Warburg-Apparatur.* Versuchsansätze wie in Tab. 3. Die Gehirnhomogenate der Normal- und „Iproniazidtiere" waren vor Zusatz des Na-Succinats 2 Std lang mit je 1 mg Serotonin vorgeschüttelt worden. ( ) = nach Abzug der „Leerwerte"

	Normaltier		Iproniazidtier		
	Aq. dest.	Serotonin	Aq. dest.	Serotonin	
	+ 6 mg Na-Succinat mm^3 O_2/60 min				
Rattengehirn . .	142	56 (— 86)	137	133 (— 4)	+ NaCN
	266	147 (— 119)	286	266 (— 20)	ohne NaCN
Meerschweinchengehirn . .	132	22 (— 110)	148	127 (— 21)	+ NaCN
	438	324 (— 114)	430	420 (— 10)	ohne NaCN

Das steht im Einklang mit Versuchsergebnissen von Mann u. Quastel, die fanden, daß die Succinatoxydation im Gehirngewebe sich durch *Tyramin* hemmen ließ, wenn dieses vorher durch die Aminoxydase oxydiert worden war, nicht aber, wenn man den Tyraminabbau durch Zusatz von Benzedrin in vitro kompetitiv hemmte oder verhinderte.

Während somit *Serotonin selbst* die Succinatoxydation nicht beeinflußt, wird sie durch die beim Abbau des Serotonins entstehenden *Oxydationsprodukte* stark gehemmt.

Diskussion

1. Ein wesentliches Ergebnis unserer Untersuchungen ist, daß *Iproniazid*, 1—2 Std vor Evipan injiziert, die Narkosedauer *verlängert*, 20—40 Std vorher injiziert, sie *verkürzt*. Die narkoseverlängernde Wirkung dürfte auf einer Hemmung des Barbituratabbaus beruhen (Eouts u. Brodie), die narkoseverkürzende Wirkung auf einer Hemmung der Monoaminoxydase des Gehirns und einer dadurch zustande kommenden Anreicherung erregend wirkender biogener Amine im Gehirn. Dafür spricht, daß *5-Oxytryptophan* und *Dopa*, die als Aminosäuren leicht ins Gehirn eindringen und hier zu den entsprechenden Aminen decarboxyliert

werden können, durch zentrale Erregung die Evipannarkose sogar verhindern, wenn sie durch Blockierung der Aminoxydase vor dem Abbau geschützt sind.

Da 5-Oxytryptophan und Tryptophan bei *Normaltieren* mit intakter Aminoxydase die Evipannarkose nicht verkürzen, sondern verlängern, könnte man annehmen, daß diese Wirkung nicht den aus den Aminosäuren im Gehirn entstandenen Aminen *selbst*, sondern deren Oxydationsprodukten zukommt. Das fände eine Parallele darin, daß der Abbau eines wichtigen Metaboliten des Gehirnstoffwechsels — der Bernsteinsäure — durch Zusatz von Serotonin nur dann gehemmt war, wenn dieses sich vorher oxydieren konnte, nicht aber, wenn die Oxydation des Amins durch Iproniazid verhindert wurde.

Reserpin, von dem bekannt ist, daß es Serotonin im Gehirn freisetzt, müßte dann an *Normaltieren* mit intakter Aminoxydase die Evipannarkose verlängern, nicht aber an „*Iproniazidtieren*" mit blockiertem Ferment, weil die nur *geringen* im Gehirn freigesetzten Aminmengen offenbar genügen, um nach oxydativer Desaminierung narkose*verlängernd* zu wirken, nicht aber, um bei verhindertem Abbau durch Iproniazid — als solche — durch centrale Erregung die Narkose zu *verkürzen* oder gar zu verhindern, wie das die nach parenteraler Injektion von Tryptophan und 5-Oxytryptophan sich bildenden *größeren* Aminmengen bei blockierter Aminoxydase tun. Schließlich würde auch verständlich, daß die narkoseverlängernde Wirkung des *Serotonins und Tryptamins* durch Iproniazid nicht in eine narkoseverkürzende Erregung umgewandelt wird: ebenso wie die kleinen, durch Reserpin im Gehirn *freigesetzten* Aminmengen hierzu nicht ausreichten, wären wohl auch die vermutlich nur geringen Mengen gefäßwirksamen Amins, welche aus dem Blut ins Gehirn *eindringen*, nicht in der Lage, Erregung und Verkürzung der Narkosedauer hervorzurufen.

Dieser Deutung der Versuchsergebnisse liegt die unbewiesene Annahme zugrunde, daß die Amine *selbst* eine andere Wirkung haben als ihre Oxydationsprodukte: die einen sollen zentral *erregend*, die anderen *sedativ* wirken. Sie würde auch nicht erklären, weshalb die *Amine* (Serotonin und Tryptamin), die zwar in gleicher Weise wie *Reserpin* und die *Aminosäuren* (5-Oxytryptophan und Tryptophan) am „Normaltier" die Evipannarkose verlängern, das im *Gegensatz* zu Reserpin und den Aminosäuren auch am „Iproniazidtier" tun.

2. Das Brenzcatechinderivat *Dopa* verursachte nach Blockierung der Monoaminoxydase durch Iproniazid zwar in gleicher Weise wie die Indolderivate *5-Oxytryptophan* und *Tryptophan* zentrale Erregung und verhinderte die Evipannarkose, war aber im Gegensatz zu den Indolderivaten nicht in der Lage, am „Normaltier" die Narkose zu verlängern. Die aus 5-Oxytryptophan und Tryptophan durch Decarboxylierung entstehenden Amine — *5-Oxytryptamin* und *Tryptamin* — haben demnach offensichtlich 2 verschiedene pharmakologische Angriffspunkte im Gehirn, von denen nur *einer* auch dem aus Dopa im Gehirn entstehenden *Oxytyramin* zukommt. Der bei *blockierter* Aminoxydase narkose*verkürzenden* Wirkung der *großen* Aminmengen, die nach Injektion der Aminosäuren im Gehirn zur Wirkung gelangen, dürfte eine *Erregung* bestimmter Gehirnzentren zugrunde liegen; die narkose*verlängernde* Wirkung der *kleinen* Aminmengen, die nach Injektion von Serotonin und Tryptamin oder der ihnen entsprechenden Aminosäuren bei *intakter* Aminoxydase

im Gehirn zur Wirkung gelangen, und die dem Dopa bzw. dem aus ihm sich bildenden Oxytyramin fehlt, muß eine *Hemmwirkung* sein.

Die Ergebnisse *elektrophysiologischer* Untersuchungen geben Anhaltspunkte für eine *Lokalisation* der Angriffspunkte dieser beiden verschiedenen Wirkungen, die vielleicht auch den cerebralen Wirkungen des *Reserpins* zugrunde liegen. Die wohl zuerst von Moruzzi u. Magoun beschriebenen und als „arousal reaction" bezeichneten EEG-Veränderungen, die durch elektrische Reizung des ascendierenden retikulären Systems hervorgerufen werden, lassen sich auch durch Pharmaka auslösen, so z. B. durch Adrenalin und Benzedrin (Porter; Hiebel u. a.), auch durch *Reserpin* (Rinaldi u. Himwich). In einer soeben erschienenen Arbeit charakterisieren Gangloff u. Monnier auf Grund ihrer Versuche an unbetäubten Kaninchen mit elektrischer Stimulierung bestimmter Hirnregionen die Reserpinwirkung als „*mixed arousal and relaxation pattern*". Aus vergleichenden Untersuchungen mit *Chlorpromazin* einerseits sowie *Reserpin* und *Serotonin* andererseits schließen sie, daß das mehr schlafähnliche Wirkungsbild des Chlorpromazins durch eine *Dämpfung* des Cortex und der Formatio reticularis des Mesencephalon bei gleichzeitiger *Aktivierung* des Thalamus zustande kommt, während Reserpin und Serotonin zwar auch durch Erhöhung der Reizschwelle die corticale Erregbarkeit *dämpfen* und dadurch eine gewisse „Indifferenz" z. B. gegenüber Umweltreizen hervorrufen, jedoch durch gleichzeitige *Stimulierung* des ascendierenden retikulären Systems („arousal reaction") und thalamische *Depression* keinen Schlaf zustande kommen lassen. Dieses Nebeneinander von *Dämpfung* und *Erregung* findet seinen Ausdruck auch darin, daß die durch Reserpin verursachte Sedation mit einer Erregbarkeitssteigerung motorischer Zentren verbunden ist und deshalb die Wirksamkeit beispielsweise des *Diphenylhydantoins* herabsetzt (Chen u. Ensor).

Aus Untersuchungen Marazzis an Katzen über den Einfluß des Serotonins auf die kontralateral abgeleiteten Aktionspotentiale bei elektrischer Stimulierung der *Sehrinde* läßt sich schließen, daß der durch Serotonin verursachten „corticalen Dämpfung" eine *Hemmung synaptischer Erregungsübertragungen* zugrunde liegt, wie sie auch dem *Adrenalin* und in schwächerem Maße dem *Noradrenalin* zukommt. Diese Serotoninwirkung wird durch Blockierung der Aminoxydase mit Iproniacid verstärkt.

a) In Analogie zu anderen biogenen Aminen, z. B. dem *Histamin*, dürfte auch für *Serotonin* zutreffen, daß nur das *freie*, nicht aber das *gebundene* Amin pharmakologisch wirksam ist. Der geringe Serotoningehalt des Gehirns (0,4—0,6 γ/g bei Maus und Ratte) spricht dafür, daß seine Bindungskapazität gering ist und deshalb leicht überschritten werden kann. Die hohe Aminoxydaseaktivität des Gehirns verhindert

jedoch eine Anhäufung freien, pharmakologisch wirksamen Serotonins. So ist verständlich, daß die Injektion des gefäßverengernden und deshalb die Blut-Gehirnschranke wohl nur schlecht durchdringenden Amins nicht zu einer *nachweisbaren* Erhöhung des Serotoningehaltes im Gehirn führt (Woolley u. Shaw). Immerhin genügten offensichtlich in den Versuchen Marazzis die kleinen nach Injektion von 10 γ Serotonin in die Carotis ins Gehirn gelangenden Mengen, um eine Hemmung der Erregungsübertragung in corticalen Synapsen und in unseren Versuchen eine Verlängerung der Evipannarkose zu verursachen.

Nach Injektion der pharmakologisch unwirksamen Aminosäure *5-Oxytryptophan*, die im Gehirn zu Serotonin decarboxyliert wird, kommt es zu einem auch *nachweisbaren* Ansteigen des Serotoningehaltes des Gehirns. 3 Std nach der intraperitonealen Injektion von 150 mg/kg war der Serotoningehalt des Gehirns bei Ratten um fast 100% erhöht (Udenfriend, Weissbach u. Bogdanski). Aber auch an der jetzt *nachweisbaren* Zunahme des „Gesamtserotonins" im Gehirn scheint die Fraktion des „freien" Amins nicht wesentlich *mehr* beteiligt zu sein als nach der Injektion des Amins *selbst:* in beiden Fällen kommt es wohl durch corticale Dämpfung (Hemmung der synaptischen Erregungsübertragung) zu einer gleich starken Verlängerung der Evipannarkose (vgl. Tab. 4, Versuchs-Nr. 2a und 4a). Jeder größere „Überschuß" an freiem Amin wird durch die Aminoxydase beseitigt. So wird verständlich, daß auch *Reserpin* durch die Freisetzung endogenen Gehirnserotonins bei intakter Aminoxydase narkoseverlängernd wirkt.

b) Blockiert man die *Mono-aminoxydase* des Gehirns mit *Iproniacid*, so wird die narkoseverlängernde Wirkung des intraperitoneal injizierten Serotonins lediglich etwas verstärkt, ähnlich wie in den Versuchen Marazzis die von ihm ausgeübte Hemmung der synaptischen Erregungsübertragung im Bereich der Sehrinde durch Iproniacid verstärkt wurde. Die relativ *kleinen* Mengen freien Amins reichen nicht aus, um durch eine genügend starke Stimulierung der Formatio reticularis („arousal reaction") die von ihnen ausgeübte „corticale Dämpfung" zu durchbrechen. *Reserpin* jedoch wirkt jetzt nicht mehr narkoseverlängernd, und *5-Oxytryptophan* — auch *Tryptophan* und *Dopa* — verursachen eine so starke Erregung, daß die Evipannarkose überhaupt nicht zustande kommt.

Für das Verständnis dieser Wirkungen ist es notwendig, sich darüber klar zu sein, was die totale Blockierung der Aminoxydase des Gehirns durch das meistens 20 Std vor Versuchsbeginn injizierte Iproniacid *an sich* bedeutet. Iproniacid blockiert das amin*abbauende* (Aminoxydase), nicht aber das amin*bildende* Ferment (Aminosäurendecarboxylase). Die Folge muß sein, daß es an *den* Stellen im Gehirn, an denen sich die serotoninbildende, möglicherweise mit der Dopadecarboxylase identische Oxytryptophandecarboxylase in besonders hoher Aktivität befindet,

durch die — bei blockiertem Abbau — ungestört erfolgende kontinuierliche physiologische Amin*bildung* zu einer Anhäufung von Serotonin kommt. Die Gehirn*rinde* ist, wie wir in voraufgegangenen Arbeiten zeigen konnten, praktisch frei von Dopa- bzw. Oxytryptophandecarboxylase, obwohl sie reichlich Aminoxydase enthält. Die höchste Decarboxylaseaktivität — und Aminoxydaseaktivität — findet sich im Stammhirn (Holtz u. Westermann 1956, 1957). Das sich hier bei blockierter Aminoxydase anhäufende freie Serotonin verursacht dann durch Stimulierung der Formatio reticularis („arousal reaction") eine Verkürzung der Narkose, die um so stärker ausgeprägt ist, je länger die Aminoxydase durch Iproniacid blockiert war (siehe Tab. 1 u. 2).

c) Injiziert man jetzt *Reserpin* oder *5-Oxytryptophan*, so ist leicht einzusehen, daß Wirkungen auftreten müssen, die zwar durch verschiedene Reaktions*mechanismen* zustande kommen, sich aber nur *graduell* voneinander unterscheiden:

Reserpin hebt die Bindungs*fähigkeit* des Gehirns für Serotonin auf, so daß bisher gebundenes, inaktives Amin frei und aktiv wird und durch die Blockierung der Aminoxydase eine Potenzierung seiner Wirkung erfährt. Das muß sich aber im Bereich des Stammhirns besonders stark auswirken, da dieses nicht nur den höchsten Ferment-, sondern auch den höchsten Serotoningehalt hat. Hier kommt es deshalb zur Freisetzung besonders großer Serotoninmengen, die ausreichen, um durch Stimulierung des ascendierenden retikulären Systems die cortical dämpfende und deshalb narkoseverlängernde Wirkung der kleinen, in der Cortex freigesetzten Aminmengen so zu kompensieren, daß Reserpin am „Iproniacidtier" die Narkose nicht mehr verlängert (siehe Tab. 4, Versuchs-Nr. 1a und 3b). Es wird dann auch verständlich, daß die intraperitoneale Injektion von *Serotonin*, die am Normaltier eine Verlängerung der Evipannarkose verursacht, trotzdem die ebenfalls narkoseverlängernde Wirkung des Reserpins aufzuheben vermag (siehe Tab. 4, Versuchs-Nr. 6a, b, c). Beim „*Normaltier*" wird das in kleinen Mengen ins Gehirn eindringende Serotonin zum größten Teil gebunden. Die kleinen, der Bindung und dem Abbau entgehenden Anteile genügen, um durch Hemmung der synaptischen Erregungsübertragung im Cortex die Narkose zu verlängern, nicht aber, um sie durch Stimulierung der Formatio reticularis zu verkürzen. Beim „Reserpintier" hingegen, dessen Gehirn das eindringende Amin nicht mehr zu binden vermag, genügt offenbar die dadurch zustande kommende Vermehrung freien Serotonins, um durch Erregung des ascendierenden retikulären Systems die narkoseverlängernde Wirkung des corticalen Serotonins zu kompensieren, so daß Reserpin die Narkosedauer unbeeinflußt läßt.

Die Injektion von *5-Oxytryptophan* kann bei blockierter Aminoxydase im Rattengehirn zu einem Anstieg des Serotoningehaltes um 600—700%

führen (Udenfriend u. Mitarb.). Die dabei auftretenden Erregungszustände — Muskeltremor, Piloerektion, Mydriasis, Tränen- und Speichelfluß — sprechen dafür, daß die „Überschwemmung" mit 5-Oxytryptophan bzw. dem durch Decarboxylierung aus diesem entstehenden 5-Oxytryptamin (Serotonin) die nur begrenzte Bindungs*kapazität* des Gehirns für Serotonin überschreitet, so daß größere Mengen *freien* Serotonins entstehen. Wiederum muß es wegen der *spezifischen Topographie der Fermentaktivitäten* zu einem *selektiven* Überschuß freien Serotonins im Bereich des ascendierenden retikulären Systems und zu einer „dosisabhängigen" Stimulierung dieses Systems kommen. Die resultierende „arousal reaction" kann so stark sein, daß — wie in unseren Versuchen (Tab. 4, Versuchs-Nr. 4a) — die narkotische Wirkung des Evipans vollständig unterdrückt wird.

Die Blockierung der Aminoxydase durch Iproniacid läßt somit die *gemeinsame Grundlage* erkennen, auf der sich die Reserpin- und Serotoninwirkung abspielt: diese ist durch die *selektive* Anhäufung freien, pharmakologisch wirksamen Amins gegeben, die durch die *spezifische* Topographie des Serotoninvorkommens und der Fermentaktivitäten im Gehirn bedingt ist.

d) Die *Analyse der Reserpinwirkung* muß berücksichtigen, daß die zu einer „arousal reaction" führende Stimulierung des ascendierenden retikulären Systems durch *Serotonin* insofern eine unspezifische Wirkung darstellt, als sie nicht nur durch die *Indol*derivate — *Serotonin*, *Tryptamin* bzw. die entsprechenden Aminosäuren —, sondern auch durch die *Brenzcatechin*derivate *Oxytyramin* bzw. *Dopa* ausgelöst werden kann. Wie *Tryptophan* und *Oxytryptophan* so verursachte in unseren Versuchen bei blockierter Aminoxydase auch *Dopa* Erregungszustände, die die Evipannarkose verhinderten (Tab. 4, Versuchs-Nr. 3c). Den von uns untersuchten Brenzcatechinabkömmlingen fehlte zwar die narkose*verlängernde* Wirkung der Indolderivate am Normaltier, die wir auf eine Hemmung der Erregungsübertragung in corticalen Synapsen zurückführten. Es ist aber bekannt, daß *Adrenalin* und in schwächerem Maße auch *Noradrenalin* die Erregungsleitung nicht nur in peripheren ganglionären, sondern auch in cerebralen Synapsen hemmen (Marazzi). Man weiß auch seit langem, daß Adrenalin bei cerebraler Applikation analgetisch und narkotisch wirkt (Bass, Leimdörfer). In letzter Zeit wurde das durch Feldberg in Versuchen an Katzen mit intraventrikulärer Injektion von Adrenalin bestätigt, und in einer soeben erschienenen Veröffentlichung wird von Reitter mitgeteilt, daß die intracisternale Injektion allerdings sehr hoher Adrenalindosen (0,5—0,7 mg/kg) bei Hunden 2—3 Std dauernde Narkose verursacht. Es wäre deshalb wahrscheinlich zu einseitig, wenn man die centralen Wirkungen des Reserpins nur unter dem Gesichtspunkt einer Freisetzung von *Serotonin* im Gehirn zu analysieren versuchte, und dabei nicht berücksichtigte, daß es unter der Reserpinwirkung auch zur Freisetzung von *Noradrenalin* bzw. „Sympathin" im *Gehirn* kommt, so daß dieses nicht nur an Serotonin, sondern auch an Noradrenalin verarmt.

Summary

1. In mice the *duration of hexobarbital or avertin anaesthesia* can be significantly *shortened* by blocking the mono-aminooxydase with *iproniacid* (isopropyl-isonicotinylhydrazid). The longer the interval is between the

injection of iproniacid and the application of the anaesthetic, the more pronounced is its „antinarcotic" action.

2. Hexobarbital anaesthesia is *prolonged* by *reserpine*, by the biogenic amines *5-hydroxytryptamine* (serotonin) and *tryptamine*, and by the corresponding amino acids, i. e. *5-hydroxytryptophane* and *tryptophane*. *Hydroxytyramine* and *dihydroxyphenylalanine* (dopa) are ineffective.

3. Prolongation of anaesthesia by the indolyl-alkylamines (tryptamine, 5-hydroxytryptamine) is potentiated by blocking the aminooxydase with iproniacid, whereas the action of reserpine is abolished, and the action of the injected amino acids, including dopa, is converted into a central excitation which will prevent the narcotic action of hexobarbital.

4. The prolongation of anaesthesia caused by reserpine in the normal animal can be abolished by the simultaneous injection of serotonin.

5. The results are discussed

a) with regard to the fact that the central effects of reserpine and serotonin show a *„mixed arousal and relaxation pattern"* consisting of an *inhibition* of the cortical synaptic nervous transmission and a *stimulation* of the ascending reticular system of the midbrain;

b) on the assumption that only *free* serotonin will be pharmacologically active, and that two different mechanisms can lead to an accumulation of free serotonin in the brain: I. Liberation of serotonin from the tissue stores by *reserpine*. II. Accumulation of serotonin when its breakdown is prevented by blocking the aminooxydase with *iproniacid*. This accumulation can be increased by injection of *5-hydroxytryptophane* particularly in regions of the brain with a high decarboxylase-activity. In this case the *capacity* of the tissue to bind serotonin is surpassed.

c) with regard to the *specific* topographic localisation of encymatic activity in different regions of the brain resulting in a *selective* accumulation of free amines under the influence of the three mentioned agents (reserpine, iproniacid and 5-hydroxytryptophane).

Literatur

Balzer, H., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 547 (1956). — Bass, A.: J. of Neur., N. S. **26**, 600 (1914). — Besendorf, H., u. A. Pletscher: Helvet. physiol. Acta **14**, 383 (1956). — Brodie, B. B., A. Pletscher and P. A. Shore: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 9 u. 46 (1956); Science (Lancaster, Pa.) **122**, 968 (1955); **123**, 992 (1956). — Chen, G., and Ch. R. Ensor: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **87**, 602 (1954). — Feldberg, W., and S. L. Sherwood: J. of. Physiol. **123**, 148 (1954). — Fouts, J. R., and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 480 (1956). — Gangloff, H., u. M. Monnier: Helvet. physiol. Acta **15**, 83 (1957). — Goldin, A., D. Dennis, J. Venditti and S. R. Humphreys: Science (Lancaster, Pa.) **121**, 364 (1955). — Hiebel, G., M. Bonvallet, P. Huve et P. Dell: Semaine Hôp. **1954**, 1880. — Holtz, P., u. E. Westermann: Naturwissenschaften **42**, 647 (1955); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 538 (1956);

231, 311 (1957). — Holzbauer, M. F., and M. Vogt: J. of Neurochem. **1**, 8 (1956). — Leimdörfer, A.: J. of Pharmacol. **98**, 62 (1950). — Mann, P. J. G., and J. H. Quastel: Biochemic. J. **34**, 414 (1940). — Marazzi, A. S., and E. R. Hart: Science (Lancaster, Pa.) **121**, 365 (1955). — Marazzi, A. S.: Ann. New York Acad. Sci. **66**, 498 (1957). — Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **1**, 455 (1949). — Paasonen, M. K., and M. Vogt: J. of Physiol. **131**, 617 (1956). — Porter, R. W.: Amer. J. Physiol. **169**, 629 (1952). — Reitter, H.: Der Anästhesist **6**, 131 (1957). — Rinaldi, F., and M. E. Himwich: Arch. of Neur. **73**, 387 (1955). — Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955). — Shore, P. A., S. L. Silver u. B. B. Brodie: Experientia (Basel) **11**, 272 (1955). — Sturtevant, F. M.: Naturwissenschaften **43**, 67 (1956). — Udenfriend, S., H. Weissbach and D. F. Bogdanski: Federat. Proc. **15**, 483 (1956). — Woolley, D. W., and E. N. Shaw: Ann. New York Acad. Sci. **66**, 649 (1957). — Zeller, E. A., u. J. Barsky: Experientia (Basel) **8**, 349 (1952). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **8**, 459 (1952). — J. of Biol. Chem. **214**, 267 (1955).

Professor Dr. P. Holtz, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 349—360 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Die Wirkung des Reserpins auf den Hormongehalt des Nebennierenmarks* ** ***

Von
G. Kroneberg und H. J. Schümann

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Vor kurzem berichteten Carlsson u. Hillarp sowie Holzbauer u. Vogt, daß Reserpin bei Kaninchen bzw. Katzen zu einer Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks führt. Nach Carlsson u. Hillarp soll die Adrenalinverarmung in gleicher Weise wie an der normalen, so auch an der denervierten Nebenniere — nach Splanchnicusdurchschneidung — zustande kommen. Demgegenüber fanden Holzbauer u. Vogt, daß die denervierte Nebenniere von der Reserpinwirkung unbeeinflußt bleibt.

Wir haben die widersprechenden Ergebnisse zum Anlaß genommen, den *Mechanismus* der Wirkung näher zu untersuchen, und in den Kreis unserer Untersuchungen auch solche Tierarten einbezogen, bei denen das Markinkret nicht wie z. B. beim Kaninchen nur aus Adrenalin besteht, sondern daneben auch Noradrenalin enthält, wie z. B. Mäuse und Katzen.

Methodik

Extraktherstellung. Die Nebennierenextrakte wurden teils nach dem von Frowein, teils nach dem von Siekevitz u. Potter angegebenen Verfahren hergestellt. In dem letztgenannten Verfahren wird das Nebennierengewebe mit 0,4 n Perchlorsäure 30 min lang im Eisschrank extrahiert. Hierauf wird abzentrifugiert und die überstehende Lösung mit 20% K_2CO_3-Lösung auf p_H 6,0 gebracht; nach 20 min Stehen bei 4° C wird vom ausgefallenen $KClO_4$ abzentrifugiert. Die überstehende klare Lösung wird zur biologischen Testung verwendet. Für die Papierchromatographie wird die Lösung mit HCl angesäuert, im Vakuum bei 40° C zur Trockne gebracht und in einem kleinen Volumen Salzsäure-Alkohol (1 cm^3 konz. HCl/1000 ml Alkohol) aufgenommen.

Biologische Austestung. *a) Katzenblutdruck.* An Katzen von 2—3 kg in Pentobarbitalnarkose (40 mg/kg i.m.) wurde der Blutdruck in der Arteria carotis mit

* Herrn Prof. Dr. K. Junkmann zum 60. Geburtstag.

** Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bewilligung von Mitteln zur Durchführung der Arbeit.

*** Siehe kurze Mitteilung in Arzneimittel-Forsch. 7, 279 (1957).

einem Hg-Manometer registriert. $^1/_4$ Std vor Versuchsbeginn wurden 1 mg/kg Atropin sulf. und 7 mg/kg Cocain. hydrochlor. i.m. injiziert.

b) Rattenuterus. Zur Differenzierung zwischen Adrenalin und Noradrenalin wurde der isolierte Rattenuterus in der von De Jalon u. Bajo angegebenen Versuchsanordnung, wie früher beschrieben, benutzt (Holtz u. Schümann 1950a).

Colorimetrische Bestimmung. Adrenalin und Noradrenalin wurden in den meisten Fällen nach dem etwas modifizierten, von v. Euler u. Hamberg angegebenen jodometrischen Verfahren bestimmt (siehe Schümann 1957). Anstatt der Acetatpuffer von p_H 4,0 und 6,0 wurden die von McIlvain angegebenen Citronensäure-Phosphatpuffer (siehe Clark) wegen ihrer besseren Pufferkapazität in diesem p_H-Bereich verwendet.

Fluorimetrische Bestimmung. In Fällen, in denen zu wenig Adrenalin und Noradrenalin in den Extrakten vorhanden war, um die colorimetrische Bestimmung durchzuführen, wurde der Gesamtamingehalt nach dem Vorgehen von v. Euler u. Floding fluorimetrisch bei p_H 6,0 mit dem Spektralphotometer PMQ II und dem Zusatzgerät ZFM 3 der Firma Zeiss bestimmt. Die Messungen erfolgten mit einer Erregerstrahlung von der Wellenlänge 365 mμ und mit dem Sperrfilter Schottglas GG 10, das diese Erregerstrahlung praktisch vollständig absorbiert.

Papierchromatographie. In einer Reihe von Versuchen wurde das Vorhandensein von Noradrenalin neben Adrenalin papierchromatographisch geprüft. Auf Schleicher u. Schüll-Papier Nr. 2043b wurde *ascendierend* in Phenol-HCl, *descendierend* in Butanol-HCl, wie in einer früheren Arbeit näher beschrieben (Schümann 1956), 24—30 Std chromatographiert.

Verwendete Substanzen. In allen Versuchen wurden L-Suprareninhydrochlorid und L-Arterenolhydrochlorid verwendet. *Reserpin, Canescin* und *Rescinnamin* standen uns als wasserlösliche Mischungen von kristallinem Alkaloid mit Ascorbinsäure (1:10) zur Verfügung[1].

Denervierung und Rückenmarkdurchtrennung. In Pernoctonnarkose (30 mg/kg i.m.) wurde bei *Kaninchen* der linke N. splanchnicus direkt unterhalb des Zwerchfells durchtrennt. Die Versuche wurden 8 Tage nach der Operation durchgeführt.

Die Rückenmarkdurchtrennung in Höhe von C_6 erfolgte ebenfalls in *Pernocton*-Narkose. 1—2 Std nach der Operation wurde Reserpin injiziert. — Bei *Ratten* erfolgte die Rückenmarkdurchtrennung in *Evipan*-Narkose (100 mg/kg i.p.). Auch hier erfolgte die Reserpininjektion 1—2 Std nach der Operation. — Als Kontrollen dienten in gleicher Weise operierte Tiere, die anstatt des Reserpinascorbinats nur die entsprechende Menge Ascorbinsäure erhielten.

1. Beeinflussung des Hormongehaltes des Nebennierenmarks durch Reserpin

a) Versuche an Kaninchen. Nach früheren Untersuchungen enthält die *Kaninchen*-Nebenniere im Gegensatz zur Nebenniere der meisten anderen Tierarten — z. B. Katze, Huhn und Maus — nur Adrenalin [Holtz u. Schümann (1950 b); Engelhardt u. Greeff]. Der Adrenalingehalt beträgt etwa 75 γ/kg Körpergewicht. An einem größeren Tiermaterial fanden wir jetzt als Mittelwert 86 γ/kg (Tab. 1, Versuch Nr. 1).

[1] Den Herstellerfirmen — Farbwerke Hoechst und C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim — sind wir für die Überlassung von Suprarenin und Arterenol sowie von Reserpin, Canescin und Rescinnamin zu Dank verpflichtet.

Tabelle 1. *Die Wirkung des Reserpins auf den Adrenalingehalt der Kaninchennebenniere*
Die Zahlen bedeuten Adrenalingehalt in γ/kg Körpergewicht

Vers. Nr.	Reserpin i.v. mg/kg	Versuchsdauer in Stunden									
		5		20		48		96		192	
			Mittel		Mittel		Mittel		Mittel		Mittel
1	— (Kontrollen)			57,7 78,9 135,3 53,5 61,1 125,0 92,0	86						
2	0,1			28,5 77,6 72,0 97,3	69	40,0 32,7 38,8 51,0	40	69,4 33,7 67,7 47,3	54		
3	0,25			15,2 61,1 37,5 22,5	34	36,0 15,0 35,7 51,0	34	34,3 28,6 36,8 43,6	36	83,3 46,6 34,1 54,4	55
4	0,5			26,2 1,5 32,5 13,2	18	25,3 11,4 9,3	15				
5	1,0	56,3 33,7 44,7	45	2,4 1,3 6,3 0,9	3	25,0 9,0 3,0	12				
6	2,0			18,7 1,2 0,5 6,3	7	11,9 3,4 7,5	8				
7	4,0	47,7 60,0 81,8 24,4 11,3 62,8 32,5	45	4,8 0,5 5,5 2,8	3	5,5 4,5	5				

Nach der intravenösen Injektion von Reserpin kommt es regelmäßig zu einer Verarmung der Nebennieren an Adrenalin, die in Abhängigkeit von Dosis und Versuchsdauer verschieden stark ist. 5 Std nach der Injektion von 1 bzw. 4 mg/kg (Versuch Nr. 5 und 7) sind die Nebennieren um etwa 50%, nach 20 Std (Versuch Nr. 5, 6, 7) um ungefähr 90—95% verarmt. 48 Std nach der Injektion der kleineren, nicht maximal wirksamen

Dosen ist die Verarmung nicht stärker als nach 20 Std. Die höheren Dosen (1—4 mg/kg) wirkten bei manchen Tieren schon tödlich. Der Tod trat dann nach 4 mg/kg im Verlaufe von 24—36 Std, nach 1—2 mg/kg Reserpin im Verlaufe von 48—96 Std ein.

Während im Bereich der höheren Dosen (1—4 mg/kg) keine signifikanten Wirkungsunterschiede feststellbar sind (Versuch Nr. 5—7), erweist sich die Wirkung im Bereich der kleineren Dosen (0,1—1 mg/kg) (Versuch Nr. 2—5) als dosisabhängig. Selbst nach den kleinsten verwendeten Dosen (0,1 und 0,25 mg/kg) war der Adrenalingehalt des Nebennierenmarks noch nach 4—8 Tagen (96—192 Std) stark erniedrigt

Tabelle 2. *Die Wirkung von Reserpin auf den Adrenalin- und Noradrenalingehalt der Katzennebenniere*

	Reserpin s. c. mg/kg	Versuchsdauer Std	Amingehalt γ/g NN	% Adrenalin
Kontrolltiere . .	—	—	1006 ($\pm$ 133)[1]	63 ($\pm$ 3,4)[1]
Katze Nr. 1 . .	0,4	20	325	60
Katze Nr. 2 . .	3,0	20	200	61
Katze Nr. 3 . .	1,0	144	61	70

[1] Mittelwert von 12 Tieren und mittlerer Fehler des Mittelwertes (nach Holland u. Schümann).

(Versuch Nr. 2 und 3). Auch in den stark an Adrenalin verarmten Nebennieren ließ sich weder biologisch, noch colorimetrisch oder papierchromatographisch *Noradrenalin* nachweisen.

Zwischen dem bekannten sedativen Effekt des Reserpins und seiner zu Adrenalinverarmung der Nebennieren führenden Wirkung scheint insofern eine gewisse Parallelität zu bestehen, als Tiere, bei denen es zu einer besonders starken Ptosis und Sedation kam, auch besonders stark an Adrenalin verarmten; andererseits besteht offensichtlich kein *zeitlicher* Zusammenhang zwischen den beiden Wirkungen, indem die sedative Wirkung von z. B. 0,5 mg/kg Reserpin im allgemeinen nach längstens 20 Std abgeklungen war, während die Adrenalinverarmung um diese Zeit erst ihr Maximum erreichte.

b) Versuche an Katzen, Mäusen und Ratten. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit mit anderer Fragestellung wurde als Durchschnittswert des *Gesamtamin*-Gehaltes (Adrenalin und Noradrenalin) des Nebennierenmarks von *Katzen* 1006 ($\pm$ 133) γ/g Nebenniere mit einem prozentualen Adrenalingehalt von 63 ($\pm$ 3,4)% ermittelt (Holland u. Schümann). Während elektrische *Splanchnicusreizung* eine bevorzugte Abgabe von Adrenalin aus dem Katzennebennierenmark veranlassen kann (Holtz, Engelhardt, Greeff u. Schümann), und hohe *Insulin*-Dosen zu einer selektiven Verarmung an Adrenalin führen (Hoekfelt),

scheint das prozentuale Mengenverhältnis der beiden Hormone unter der *Reserpin*-Wirkung trotz stärkster Abnahme des Gesamtamingehaltes unverändert zu bleiben (Tab. 2).

Die *Ratten*-Nebenniere enthält nach unseren früheren Untersuchungen [Holtz u. Schümann (1951), Schümann (1951)] kein Noradrenalin. Das ließ sich an dem für die Versuche 1—3 in der Tab. 3 benutzten Tiermaterial bestätigen. Reserpin verursachte selbst in der hohen Dosis von

Tabelle 3. *Die Wirkung von Reserpin und Insulin auf den Adrenalin- und Noradrenalingehalt der Rattennebenniere*

Vers. Nr.	mittleres Tiergewicht g	Tierzahl	Dosis	Versuchsdauer Std	Amingehalt γ/kg	% Adr.	% Nor.
1	260	6	Kontrollen	20	128	100	—
	264	15	10 mg/kg Reserpin	20	96	100	—
2	240	5	Kontrollen	10	153	100	—
	245	5	10 mg/kg Reserpin	10	95	100	—
3	186	5	Kontrollen	20	137	100	—
	188	5	10 mg/kg Reserpin	20	63	100	—
4	148	5	Kontrollen	20	163	80	20
	142	15	10 mg/kg Reserpin	20	52	100	—
5	126	7	Kontrollen	20	135	92	8
	122	15	10 mg/kg Reserpin	20	75	100	—
6	100	3	a) Kontrollen	10	187	83	17
	93	6	b) 10 mg/kg Reserpin	10	85	100	—
	95	5	c) 15 E/kg Insulin	8	46	76	24
7	250	4	a) Kontrollen	10	134	87	13
	235	4	b) 10 mg/kg Reserpin	10	76	100	—
	245	5	c) 15 E/kg Insulin	4	60	87	13
8	260	3	a) Kontrollen	10	147	92	8
	335	3	b) 10 mg/kg Reserpin	10	66	100	—
	300	3	c) 15 E/kg Insulin	4	97,5	86	14

10 mg/kg nach 10—20 Std eine weit schwächere Adrenalinverarmung als kleinere Dosen das bei Kaninchen tun. — Für die Versuche 4—8 (Tab. 3) stand uns ein Tiermaterial zur Verfügung, bei dem sich auch Noradrenalin im Nebennierenmark fand. Während höhere *Insulin*-Dosen (25 E/kg) in früheren Untersuchungen des Institutes (Engelhardt u. Greeff) eher den relativen (prozentualen) Noradrenalingehalt erhöhten oder sogar Noradrenalin, wenn dieses vorher nicht nachweisbar war, auftreten ließen, kommt es bei der durch *Reserpin* verursachten Hormonverarmung der Rattennebenniere zum Verschwinden des vorher vorhandenen Noradrenalins, so daß die Nebennieren nur noch Adrenalin enthalten (Tab. 3, Versuch Nr. 4, 5, 6b, 7b, 8b). Der Unterschied zwischen Reserpin- und

Insulinwirkung wird deutlich bei einem Vergleich dieser Versuche mit den Versuchen Nr. 6c, 7c und 8c.

Ähnliche Resultate hatten Versuche an Mäusen (Tab. 4). Die Kontrollgruppen hatten einen Noradrenalingehalt von 22—46%, die mit Reserpin behandelten Tiere dagegen von 0—20%. Unter der Einwirkung von Reserpin kommt es demnach wie bei Ratten so auch bei Mäusen zu einer Abnahme des prozentualen Noradrenalingehaltes.

Tabelle 4. *Die Wirkung des Reserpins auf den Adrenalin- und Noradrenalingehalt der Mäusenebenniere*

Vers. Nr.	mittleres Tiergewicht g	Tierzahl	Reserpin s. c. mg/kg	Versuchsdauer Std	Amingehalt γ/kg	% Adr.	% Nor.
1	18	10	Kontrollen	48	294	67	33
	15	20	10	48	89	82	18
2	16	10	Kontrollen	72	401	54	46
	16	20	1,5	72	145	80	20
3	33	10	Kontrollen	20	415	78	22
	34	10	10	20	289	100	—

2. Beeinflussung des Adrenalingehaltes der Kaninchennebenniere durch andere sedativ wirkende Rauwolfiaalkaloide

Wie schon erwähnt, verarmen die Nebennieren solcher Kaninchen, die auf eine bestimmte Reserpindosis mit einer besonders starken Sedation reagieren, auch besonders stark an Adrenalin. Wir haben untersucht, ob auch bei anderen sedativ wirkenden Rauwolfiaalkaloiden — *Canescin, Rescinnamin* — Beziehungen zwischen sedativer und zu Adrenalinverarmung führender Wirkung bestehen. Nach Cerletti, Konzett u. Taeschler wirkt *Canescin* ungefähr gleich stark sedativ wie Reserpin, *Rescinnamin* jedoch schwächer (Kroneberg). Vergleichende Untersuchungen hatten das Ergebnis, daß auch die Wirkung auf das Nebennierenmark beim *Rescinnamin* am schwächsten ist; selbst 4 mg/kg verursachten eine weniger starke Adrenalinverarmung als 2 mg/kg *Reserpin* bzw. *Canescin*.

3. Vergleichende Untersuchungen mit Reserpin, Chlorpromazin, Urethan und Pentobarbital

Wenn sich auch in den vorangegangenen Untersuchungen eine gewisse Parallelität zwischen sedativer und zu Adrenalinverarmung führender Wirkung ergab, so ist doch unwahrscheinlich, daß es sich um einen kausalen Zusammenhang handelt, derart etwa, daß Stoffe mit stark sedativer oder gar narkotischer Wirkung zu einer Abnahme des Adrenalingehaltes des Nebennierenmarks führen. — So ergaben denn auch Versuche an *Kaninchen* mit narkotisch wirkenden Dosen von *Urethan* und

Pentobarbital sowie mit *Chlorpromazin* in deutlich sedativ wirksamer Dosierung, daß die Nebennieren trotz der starken *pharmakologischen* Wirkung ihren normalen Adrenalingehalt behielten (Tab. 5); nach Pentobarbital war er sogar etwas erhöht.

An *Ratten* haben wir untersucht, ob *Kälteeinwirkung* die Reserpinwirkung auf das Nebennierenmark beeinflußt, und auch hier Vergleichsversuche mit *Urethan* und *Chlorpromazin* gemacht. Aus der Tab. 6 ist zu ersehen, daß die während der Versuchsdauer von 10 Std bei 8° C gehaltenen Tiere nach Reserpin stärker an Adrenalin verarmen als die bei 25° C gehaltenen. Bei den unter Chlorpromazin- und Urethanwirkung stehenden Tieren hingegen kommt es trotz der Kälteapplikation ebensowenig wie bei den unbehandelten Kontrollen zu einer Abnahme des Nebennierenadrenalins. Hier führt der Kältereiz vielmehr — ebenso wie bei den Kontrollen — zu einer Zunahme des Adrenalingehaltes.

Tabelle 5. *Adrenalingehalt der Kaninchennebenniere 20 Std nach Injektion von Urethan, Pentobarbital und Chlorpromazin*

	Adrenalingehalt (γ/kg)	
		Mittel
Kontrollen	75	
	89	70
	75	
	46	
Urethan	73	
(1,5 g/kg s. c.)	65	77
	45	
	125	
Pentobarbital	88	
(40 mg/kg s. c.)	133	
	105	107
	87	
	124	
Chlorpromazin	60	
(10 mg/kg i.v.)	89	74
	75	

Die verschiedene Reaktion des Nebennierenmarks auf den Kältereiz bei den mit *Reserpin* bzw. mit *Urethan* oder *Chlorpromazin* behandelten Tieren macht verständlich und dürfte die Erklärung dafür sein, daß auch die *Körpertemperatur* sich während der Kälteeinwirkung verschieden verhält (Abb. 1). Während sie bei den Reserpintieren im Vergleich mit den Kontrollen in 10 Std nur wenig absinkt (auf 32° C), nimmt sie bei den Chlorpromazintieren bis auf 27—28° C, bei den Urethantieren schon nach 6 Std bis auf 25° C ab. Auch der zeitliche Verlauf der Temperaturkurve zeigt charakteristische Unterschiede. Die Reserpintiere vermögen ihre Körpertemperatur trotz der Kälteeinwirkung 4 Std lang auf normaler Höhe zu halten, bei den Chlorpromazin- und Urethantieren hat sie in dieser Zeit schon ihren Tiefpunkt erreicht (Abb. 1). — *Chlorpromazin* und *Urethan* führen demnach sehr bald zu einer Ausschaltung der Regulationsmechanismen, die der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur dienen, während diese unter *Reserpin* noch lange erhalten bleiben. Da dem *Adrenalin* auf Grund seiner bekannten „*calorigenen*" Wirkung Bedeutung für die Temperaturregulation zukommt, sind die aus unseren

Versuchen sich ergebenden Beziehungen zwischen Adrenalingehalt der Nebennieren und Körpertemperatur unter Kälteeinwirkung von besonderem Interesse. Die unter *Reserpin* und Kälteeinwirkung, nicht aber die

Tabelle 6. *Beeinflussung des Adrenalingehaltes der Rattennebenniere durch Reserpin, Chlorpromazin, Urethan und Kälteeinwirkung*

Tierzahl	Dosis s. c.	Versuchsdauer Std	Adrenalingehalt (γ/kg)	
			bei 25° C	bei 8° C
je 2	Kontrollen	10	140	214
je 3	Kontrollen	10	128	150
je 3	8 mg/kg Reserpin	10	86	32
je 2	8 mg/kg Reserpin	10	88	13
je 3	20 mg/kg Chlorpromazin	10	152	203
je 2	1,5 g/kg Urethan	6	155	196
je 2	1,5 g/kg Uretahn	6	—	175

unter *Chlorpromazin* und *Urethan* erfolgende, zu Hormonverarmung der Nebennieren führende Adrenalinausschüttung dürfte maßgeblich daran beteiligt sein, daß bei den Reserpintieren die Körpertemperatur lange Zeit konstant bleibt und auch im weiteren Verlaufe des Versuchs nur relativ wenig absinkt.

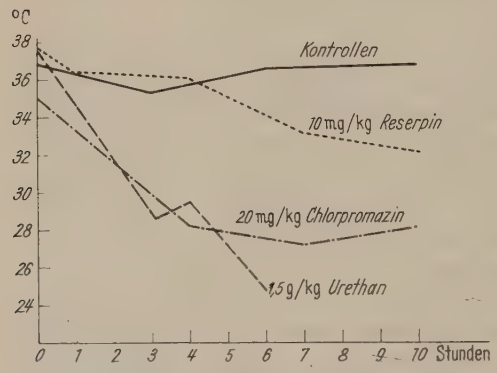


Abb. 1. *Die Wirkung von Reserpin, Chlorpromazin und Urethan auf die Körpertemperatur von Ratten.* Gruppen von je 3 Tieren (Mittelwerte), Umgebungstemperatur 8° C

4. Die Wirkung des Reserpins auf die innervierte und denervierte Nebenniere

In der Einleitung wurde schon auf die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen verschiedener Autoren hingewiesen; Holzbauer u. Vogt, fanden, daß Reserpin nur an der intakten, innervierten Nebenniere zur Adrenalinverarmung führt, nach Carlsson u. Hillarp dagegen soll auch das denervierte Organ seinen Hormongehalt verlieren.

8 Tage nach der *Splanchnicotomie* (siehe Methodik) war der Adrenalingehalt der *denervierten* Nebenniere bei Kaninchen nicht signifikant verschieden von demjenigen der *innervierten* (Tab. 7, Kontrollen). Nach der hohen Reserpindosis von 4 mg/kg verarmte die normale, innervierte Nebenniere schon nach 5—10 Std stark an Adrenalin und war nach

20—48 Std praktisch hormonfrei. Auch die *denervierte* Nebenniere verarmte an Adrenalin, aber weit schwächer; die nach 20 Std erreichte Verarmung nahm bis zur 48. Std nicht mehr zu, so daß die denervierte Nebenniere zu einer Zeit, zu der die normale fast adrenalin-frei war, noch beinahe die Hälfte des normalen Hormongehaltes besaß (Tab. 7, Versuch Nr. 1—4).

Während somit nach großen Dosen die innervierte Nebenniere deutlich stärker an Adrenalin verarmt als die denervierte, fanden sich nach

Tabelle 7. *Die Wirkung von Reserpin auf den Adrenalingehalt der innervierten und denervierten Kaninchennebenniere.* (Splanchnicotomie)

Vers. Nr.	Reserpin i.v. mg/kg	Versuchsdauer Std	Adrenalingehalt (γ/kg)			
			innervierte NN		denervierte NN	
				Mittel		Mittel
1	— (Kontrollen)	20	77 100 157 75 54	92	77 82 157 72 60	89
2	4,0	5	16 24,5	20	38 78	58
3	4,0	10	35,5 34 5	25	75 61 52	62
4	4,0	20	1,8 0,4 1,1 0,4	0,9	26 29,6 56 38	37
5	4,0	48	0,3 4,8 3,7 2,4	2,8	20 60 37,5 36,4	38
6	0,25	20	57 60 45 39 34	47	57 48 49 35 59	49
7	0,1	48	44 51 56	50	51 60 67	59

kleineren Dosen (0,1 und 0,25 mg/kg) keine Unterschiede: beide Nebennieren verarmten praktisch gleichstark (Tab. 7, Versuch Nr. 6 und 7).

Versuche, in denen die nervale Ausschaltung des Nebennierenmarks durch *Rückenmarkdurchschneidung* (C_6) vorgenommen wurde, hatten ein prinzipiell anderes Ergebnis. 4 mg/kg Reserpin, d. h. eine Dosis, die

erfahrungsgemäß nach 20 Std zu einer totalen Verarmung der Nebennieren beim *Normaltier* führt (vgl. Tab. 1, Versuch Nr. 7), verursachte bei den operierten Tieren keine signifikante Abnahme des Adrenalingehaltes gegenüber den in gleicher Weise operierten, aber nicht mit Reserpin behandelten Kontrolltieren (Tab. 8).

Tabelle 8. *Versuche mit Reserpin an Kaninchen mit Rückenmarkdurchschneidung* Die Zahlen bedeuten Adrenalingehalt in γ/kg Körpergewicht. (Vgl. Methodik)

Versuchsdauer Std	Kontrollen		4 mg/kg Reserpin i.v.	
		Mittel		Mittel
5	98 60 76	78	55 83 84 83 60 62	71
10	—	—	58 78 100	78
20	50 88 97 55	72	71 117 54	80

Tabelle 9. *Versuche mit Reserpin an Ratten mit Rückenmarkdurchschneidung.* Die Zahlen bedeuten Adrenalingehalt in γ/kg Körpergewicht. (Vgl. Methodik)

Versuchsdauer Std	Kontrollen		10 mg/kg Reserpin s. c.	
		Mittel		Mittel
10	194 245 150	196	86 57 71	71
20	139 154 162	152	99 97 69	88
48	83 112 132 130	114	39 61 56 63	55

Demgegenüber kam es bei *Ratten* trotz der in Höhe von C_6 vorgenommenen Durchschneidung des Rückenmarks nach Reserpin noch zu einer Adrenalinverarmung der Nebennieren, die von gleichem Ausmaß wie bei normalen Tieren war (Tab. 9).

Diskussion

Für ein wesentliches Ergebnis unserer Untersuchungen halten wir, daß die nervale Ausschaltung der Nebennieren durch Rückenmarkdurchschneidung in Höhe von C_6 sich bei verschiedenen Tierarten — Kaninchen und Ratten — verschieden auswirkt auf die zu Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks führende Wirkung des Reserpins. Bei *Kaninchen*, die so sehr empfindlich schon auf kleine Reserpindosen reagieren, wird die am Normaltier zu totaler Hormonverarmung führende Wirkung des Reserpins durch Rückenmarkdurchschneidung verhindert, bei der gegenüber Reserpin relativ unempfindlichen *Ratte* hingegen nicht. Während somit der Wirkung des Reserpins auf das Nebennierenmark beim Kaninchen offenbar überwiegend, wenn nicht ausschließlich ein zentral-nervaler Mechanismus zugrunde liegt, scheint die Reserpinwirkung bei der Ratte einen vornehmlich peripheren Angriffspunkt zu haben. Die großen Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den beiden Tierarten könnten deshalb ihre Ursache darin haben, daß der *zentral-nervale* Mechanismus schon durch kleine Reserpindosen, der *periphere* dagegen erst durch hohe Dosen ausgelöst wird. So erscheint es nicht ausgeschlossen, daß *sehr* hohe Dosen (10 mg/kg und mehr) vielleicht auch die nerval ausgeschaltete Nebenniere des Kaninchens an Adrenalin verarmen lassen würden.

Wenn deshalb sowohl in den einleitend erwähnten Untersuchungen der schwedischen Forscher (Carlsson u. Hillarp) als in unseren eigenen Versuchen die Kaninchennebenniere auch nach *Splanchnicotomie* noch auf hohe Reserpindosen an Adrenalin verarmt — wenn auch schwächer als die innervierte — so kann die verschiedene Auswirkung der Rückenmark- bzw. Splanchnicusdurchschneidung wohl kaum eine andere Ursache haben, als daß der eine Eingriff eine *vollständige*, der andere hingegen nur eine *unvollständige* Denervierung des Nebennierenmarks darstellt, obwohl auf Grund *anatomischer* Befunde (siehe z. B. Hoschi) einseitige Splanchnicusdurchschneidung beim Kaninchen eine totale Denervierung der entsprechenden Nebenniere bedeutet. Ungeklärt bleibt, weshalb kleine Reserpindosen (0,1—0,25 mg/kg), die keine *maximale* Adrenalinverarmung verursachen, beim Kaninchen nach Splanchnicotomie von gleicher Wirksamkeit an der normalen und „denervierten" Nebenniere sind.

Summary

1. Like Reserpine the Rauwolfia alkaloids Canescine and Rescinnamine deplete the adrenaline stores of the adrenal medulla of rabbits. Rescinnamine the least sedative acting drug also causes the smallest depletion of the suprarenals.

2. Rabbits react with a more severe depletion of the adrenal medulla than rats and mice.

3. Other sedative drugs like Pentobarbitone, Urethane and Chlorpromazine do not change the adrenaline content of the adrenal gland.

4. In *cats* the percentage content of adrenaline and noradrenaline remaines unchanged irrespectively of the degree of depletion, while in *rats* and *mice* after the injection of Reserpine the percentage of adrenaline was found to be greater than that in the normal gland.

5. Experiments on rabbits in which the adrenal gland had been *denervated* lead to the following results:

a) After denervation of one gland by cutting the splanchnic nerve a week previously Reserpine in a large dose (4 mg./kg.) depleted much more the intact gland than the denervated one. On the other hand the depletion of both glands was nearly equal after the administration of 0,1 or 0,25 mg./kg.

b) After section of the spinal cord at the level of C_6 Reserpine was found to be ineffective.

6. In contrast to *rabbits* Reserpine caused a normal depletion of the adrenal gland after section of the spinal cord in *rats*.

7. The experiments were undertaken to find out whether the depletion of the adrenal medulla is due to a central or a peripheral action of Reserpine.

Literatur

Carlsson, A., and N. A. Hillarp: Kgl. Fysiogr. Sällsk. Hdl. **26**, Nr. 8 (1956). — Cerletti, A., H. Konzett and M. Taeschler: Experientia **11**, 98 (1955). — Clark, W. M.: The determination of hydrogen ions. 3rd. ed., p. 124 (1928). London: Ballière, Tindall and Cox. — De Jalon, P. G., J. B. Bayo und M. G. De Jalon: Farmacoterap. act. **2**, 313 (1945). — Engelhardt, A., u. K. Greeff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 211 (1953). — Euler, U. S. v., and U. Hamberg: Acta physiol. scand. (Stockh.) **19**, 74 (1949). — Euler, U. S. v., and J. Floding: Acta physiol. scand. (Stockh.) **33**, Suppl. **118**, 45 (1955). — Frowein, B.: Biochem. Z. **134**, 558 (1923). — Hoekfelt, B.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **53**, 536 (1953). — Holland, W. C., and H. J. Schümann: Brit. J. Pharmacol. **11**, 449 (1956). — Holtz, P., u. H. J. Schümann: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 417 (1950a). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 1 (1950b). — Experientia **7**, 192 (1951). — Holtz, P., A. Engelhardt, K. Greeff u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 58 (1952). — Holzbauer, M., and M. Vogt: J. Neurochem. **1**, 8 (1956). — Hoshi, T.: Inst. allg. Path. u. path. Anat. Tohoku Universität Sendai **3**, 328 (1926). — Kroneberg, G.: Arzneimittel-Forsch. **6**, 579 (1956). — Schümann, H. J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **87**, 212 (1951). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 566 (1956). — J. of Physiol. **137**, 318 (1957). — Siekevitz, P., and V. R. Potter: J. of Biol. Chem. **200**, 187 (1953).

Priv.-Dozent Dr. H. Schümann und Dr. G. Kroneberg,
Pharmakolog. Institut der Universität Frankfurt am Main

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 361—372 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Die Beeinflussung der Reserpinwirkung auf das Nebennierenmark durch Hemmung der Mono-aminoxydase* **

Von
P. Holtz, H. Balzer und E. Westermann

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Eine der charakteristischsten Eigenschaften des Rauwolfiaalkaloids *Reserpin* ist, das Bindungsvermögen der Zellen und Gewebe für biogene Amine aufzuheben, so daß diese die in Bindung gehaltenen Wirkstoffe freigeben. Das hat zur Folge, daß Amine, die bisher in pharmakologisch unwirksamer Form vorlagen, pharmakologisch aktiv, andererseits aber auch dem Abbau durch die Mono-aminoxydase zugänglich werden, so daß es zur Verarmung des Gewebes an dem betreffenden Stoff kommen kann. Die Wirkung spielt sich auch an *Einzelzellen* ab und führt z. B. in Thrombocyten und Mastzellen zu Freisetzung von *Serotonin* (5-Oxytryptamin). Besonderes Interesse hat die Beobachtung erregt, daß Reserpin auch im *Gehirn* eine Freisetzung von *Serotonin* (Brodie, Pletscher and Shore) und *Nor-adrenalin* bzw. „Sympathin" (Vogt u. Paasonen) verursacht, und daß die *Nebennieren* unter der Reserpinwirkung an Hormon verarmen (Carlsson u. Hillarp [1]; Holzbauer u. Vogt).

Die sozusagen „physikalisch-chemische", die Freisetzung von biogenen Aminen bewirkende Eigenschaft des Rauwolfiaalkaloids hat zu der Frage geführt, ob und wieweit seine pharmakologischen Wirkungen sich mit einer solchen Freisetzung körpereigener Wirkstoffe erklären lassen. Das scheint am ehesten für einige in der *Peripherie* auftretende Wirkungen möglich. So ließe sich wohl die fast regelmäßig im Anschluß an die Injektion von Reserpin auftretende *Darmerregung* und Defaekation auf die lokale Freisetzung darmerregenden Serotonins zurückführen.

Schwieriger ist die Frage zu beantworten, ob zwischen bestimmten *zentralen* Wirkungen des Reserpins und der Freisetzung biogener Amine im *Gehirn kausale* Beziehungen bestehen. In einer voraufgegangenen Arbeit über die Beeinflussung der *Evipannarkose* durch Reserpin und biogene Amine konnten wir solche Beziehungen wahrscheinlich machen,

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
** Herrn Professor Dr. F. Hildebrandt zum 70. Geburtstag.

indem wir die Wirkung körpereigener Amine, besonders des *Serotonins*, mit derjenigen des *Reserpins* verglichen und durch Blockierung der Aminoxydase mit *Iproniazid* (Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid) zu verstärken oder zu modifizieren versuchten (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler).

Das *Nebennierenmark* nimmt unter den Organen des Körpers insofern eine Sonderstellung ein, als es die größte Bildungs- und Speicherungsstätte biogener Amine ist, denen hier hormonale Funktionen zukommen, und andererseits die Sekretion und Freisetzung der Nebennierenmarkhormone sowohl einer *nervalen* Regulation unterliegt als auch *direkter* Beeinflussung zugänglich ist. Es war deshalb von Interesse, die hormonfreisetzende und zur Hormonverarmung der Nebennieren führende Wirkung des Reserpins daraufhin zu untersuchen, ob sie über die normale Innervation durch den N. splanchnicus zustande komme oder nur auf der Eigenschaft des Reserpins beruhe, unabhängig von aller Innervation auch in Einzelzellen, z. B. Thrombocyten, das Speicherungs- und Bindungsvermögen für biogene Amine aufzuheben, so daß diese frei und durch die Aminoxydase abgebaut werden können.

Wir haben untersucht, ob und wie die zur *Adrenalinverarmung* der Nebennieren führende Wirkung des Reserpins durch eine Hemmung des aminabbauenden Fermentes mit Iproniazid beeinflußt wird.

Versuche

Methodik. *Serotoninbestimmung im Gehirn.* Weiße Ratten wurden durch Dekapitation getötet, und das gesamte Gehirn nach der Methode von Amin, Crawford u. Gaddum extrahiert: 1 ml Extrakt entsprach 0,5 g Gehirn. Die Austestung gegen Serotonin (5-Oxytryptamin-Kreatininsulfat) erfolgte am östralen Rattenuterus, der in einem 4 ml-Tyrodebad suspendiert war (Gaddum u. Vogt).

Adrenalinbestimmung im Nebennierenmark. Die Nebennieren wurden mit Perchlorsäure nach Siekevitz u. Potter extrahiert und der Adrenalingehalt (Gesamt-Brenzkatechingehalt) am *Katzenblutdruck* oder *colorimetrisch* nach v. Euler u. Hamberg bzw. *fluorimetrisch* nach v. Euler u. Floding bestimmt.

Verwendete Substanzen[1]. *Reserpin* als 10% Alkaloid enthaltendes Ascorbinat der Firma C. F. Boehringer-Mannheim s. c.; *Serpasil* der Firma CIBA-Basel, in etwas Gummi arab. aufgeschwemmt, i. p.; *Iproniazid* (Marsilid; Isopropyl-isonicotinsäurehydrazid) der Firma Hoffmann-La Roche; *5-Oxytryptophan* (Hoffmann-La Roche); *Serotonin* (5-Oxytryptamin-Kreatininsulfat) der Firma C. H. Boehringer-Ingelheim; *Dopa* (Dioxyphenylalanin) [Hoffmann-La Roche]; *Insulin* (Hoechst).

1. Serotoningehalt des Gehirns und Adrenalingehalt des Nebennierenmarks nach Reserpin und Iproniazid

Die *Empfindlichkeit*, mit der die einzelnen Tierarten auf Reserpin mit einer Abnahme des Adrenalingehaltes des Nebennierenmarks reagieren, ist sehr verschieden. Bei *Kaninchen* führte die subcutane Injektion von

[1] Den genannten Firmen danken wir für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen, insbesondere der Firma Hoffmann-La Roche für 5-Oxytryptophan.

0,5—5 mg/kg *Reserpin* nach 10—20 Std zu einer fast vollständigen Hormonverarmung. *Meerschweinchen* reagierten weniger empfindlich. Die hohe Dosis von 10 mg/kg *Reserpin* verursachte nach 20—24 Std nur eine Abnahme um 50—75%. Bei *Ratten* kam es nach 10 mg/kg nur zu einem Absinken des Hormongehaltes um ungefähr 50%.

Die Abb. 1 A gibt ein Beispiel für 4 gleichsinnig verlaufene Versuche an *Ratten*, in denen 20—24 Std nach der subcutanen Injektion von 10 mg/kg Reserpin und 100 mg/kg Iproniazid der *Serotonin*-Gehalt des *Gehirns* und der Adrenalingehalt der Nebennieren bestimmt wurde. *Reserpin* hatte zu einer Verarmung an Serotonin um mehr als 50% geführt (*K* und *R*), *Iproniazid* zu einer Zunahme des Serotoningehaltes (*J*). Die Gehirne der mit Iproniazid vorbehandelten Tiere (Iproniazid 4 Std vor Reserpin) waren nach Reserpin nicht an Serotonin verarmt (*R* + *J*), sondern enthielten mehr als die unbehandelten Kontrollen (*K*).

Bei den gleichen Tieren hatte Reserpin auch eine Verarmung der *Nebennieren* an *Adrenalin* um ungefähr 50% verursacht (Abb. 1 B, *K* und *R*). Diese ließ sich ebenso wie die Serotoninverarmung des Gehirns durch Iproniazid verhindern (*R* + *J*). — Die Tab. 1 enthält das Ergebnis von 8 weiteren Versuchen.

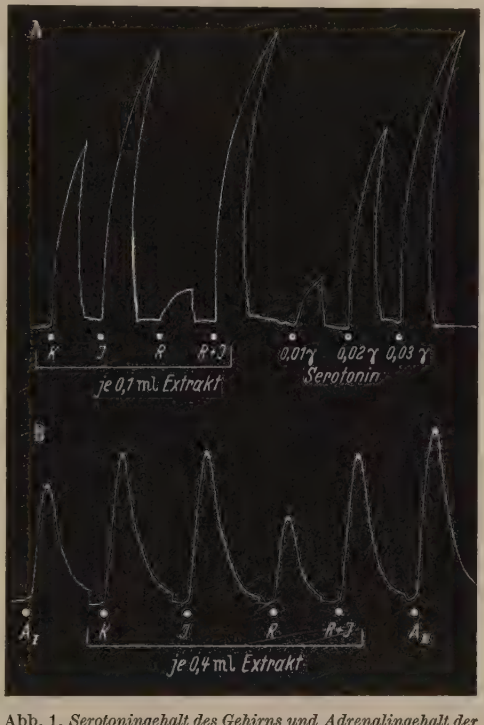


Abb. 1. *Serotoningehalt des Gehirns und Adrenalingehalt der Nebennieren nach Reserpin und Iproniazid.* Gruppen von je 4 Ratten (Körpergewicht pro Gruppe 400—420 g). *K* = Kontrollgruppe: 90 mg/kg Ascorbinsäure s. c. *J* = Iproniazidgruppe: 100 mg/kg Iproniazid i. m. *R* = Reserpingruppe: 100 mg/kg Reserpinascorbinat (10 mg/kg Reserpin) s. c. *R* + *J* = Reserpin-Iproniazidgruppe: Iproniazid (100 mg kg i.m.) 4 Std vor Reserpin (10 mg/kg s. c.). — 20 Std nach der Reserpininjektion wurden die Tiere zur Bestimmung des Serotoningehaltes des Gehirns und Adrenalingehaltes der Nebennieren getötet (siehe Methodik)

A. Serotoninbestimmung am Rattenuterus. Ergebnis: 0,1 ml Gehirnextrakt (1 ml = 0,5 g Gehirn) entspricht für *K* etwa 0,02 γ Serotonin = 0,4 γ Serotonin/g Gehirn, *R* etwa 0,01 γ Serotonin = 0,2 γ Serotonin/g Gehirn, *R* + *J* etwa 0,03 γ Serotonin = 0,6 γ Serotonin/g Gehirn

B. Adrenalinbestimmung am Katzenblutdruck. Injektion von je 0,4 ml = 1/10 der Extraktmenge. A_I = 5 γ Adrenalin (Base); A_{II} = 7,5 γ Adrenalin (Base). *Ergebnis:* Reserpin verursacht eine fast 50%ige Verarmung der Nebennieren an Adrenalin. Iproniazid verhindert diese

Tabelle 1. *Adrenalingehalt der Nebennieren von Ratten nach Reserpin und Iproniazid* K: (Kontrolltiere) 90 mg/kg Ascorbinsäure s. c. J: (Iproniazidtiere) 100 mg/kg Iproniazid i. m. R: (Reserpintiere) 100 mg/kg Reserpinascorbinat = 10 mg/kg Reserpin s. c. R + J: (Reserpin-Iproniazidtiere) 100 mg/kg Iproniazid i. m.; 4 bis 6 Std später 100 mg/kg Reserpinascorbinat s. c. +: 20 mg/kg Serpasil (Ciba) in Gummi arabicum suspendiert i. p. anstatt 10 mg/kg Reserpin s. c. Adrenalingehalt der Nebennieren in γ/kg Körpergewicht. Raumtemperatur 22° C

Vers. Nr.	Anzahl der Tiere u. Gewicht je Gruppe	K	J	R	R + J	Std nach Reserpin
1	5 (400—420)	122	—	95	115	9
2	5 (410—430)	110	—	51	120	20
3	4 (400—420)	148	153	70	161	20
4	3 (340—360)	138	146	79	165	20
5	3 (250—270)	205	187	107	163	40
6	3 (380—400)	197	197	155	180	6
7	3 (330—390)	180	157	89	198	15
8+	8 (780—820)	187	181	55	117	25

Tabelle 2. *Adrenalingehalt der Nebennieren von Meerschweinchen und Kaninchen nach Reserpin und Iproniazid*

Meerschweinchen (250—310 g); *Kaninchen* (2,1—3,4 kg). K: (Kontrolltiere) Ascorbinsäure in entsprechender Menge s. c. J: (Iproniazidtiere) 100 mg/kg Iproniazid i. m. R: (Reserpintiere) 5—100 mg/kg Reserpinascorbinat = 0,5—10 mg/kg Reserpin s. c. R + J: (Reserpin-Iproniazidtiere) 100 mg/kg Iproniazid 4—6 Std vor Reserpin i. m. Adrenalingehalt der Nebennieren in γ/kg Körpergewicht.

Reserpin (mg/kg)	Tierart	K	J	R	R + J	Std nach Reserpin
10	Meerschweinchen (je 3 Tiere)	148	149	73	73	19
10	Meerschweinchen	227	244	86	105	24
10	Meerschweinchen	177	190	42	35	20
10	Meerschweinchen	181	150	36	26	20
5	Kaninchen	70	—	6	11	8
2	Kaninchen	74	—	0	0	24
0,5	Kaninchen	68	—	9	28	20

So regelmäßig sich diese Ergebnisse an *Ratten* reproduzieren ließen, war es nicht möglich, bei *Meerschweinchen* und *Kaninchen* die nach

Reserpin zustande kommende Hormonverarmung der Nebennieren durch Hemmung der Aminoxydase mit Iproniazid zu verhindern. Die Tab. 2 gibt einige Versuchsbeispiele.

2. Hyperglykämie und Adrenalingehalt der Nebennieren nach Reserpin und biogenen Aminen

Nach KUSCHKE u. FRANTZ wirkt Reserpin bei *Kaninchen* hyperglykämisch. Wir können das bestätigen: nach Reserpin kommt es meistens mit einer Latenz von 2—3 Std zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels,

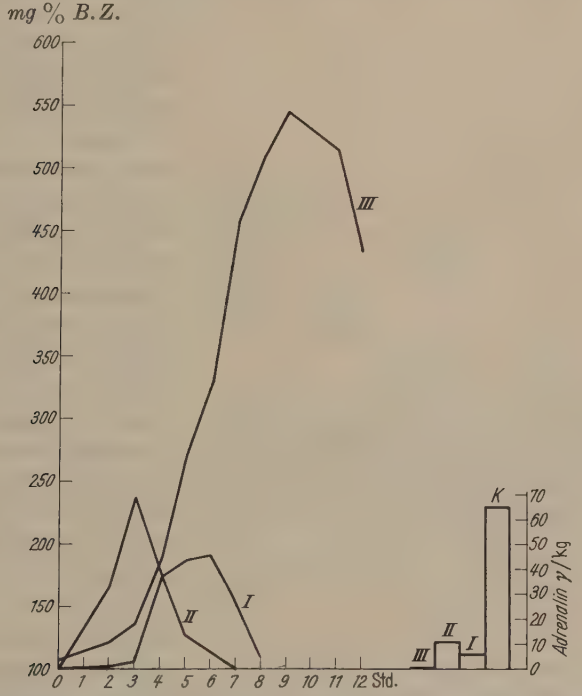


Abb. 2. *Hyperglykämische Wirkung des Reserpins bei Kaninchen. I* Kaninchen (3,7 kg), 2 mg/kg Reserpin s. c., *II* Kaninchen (3,7 kg), 5 mg/kg Reserpin s. c., *III* Kaninchen (3,1 kg), 5 mg/kg Reserpin s. c., *K* = Durchschnittlicher Adrenalingehalt der Nebennieren von Kontrolltieren (65 γ/kg Körpergewicht)

die von Tier zu Tier sehr verschieden stark ausgeprägt ist und deshalb keine direkte Dosisabhängigkeit erkennen läßt (Abb. 2). Tötet man die Tiere, wenn der erhöhte Blutzuckerspiegel wieder abgesunken ist, und untersucht die Nebennieren, so findet man, daß der Adrenalingehalt stark abgenommen hat (Abb. 2).

Wenn diese Wirkungen durch die Freisetzung *biogener Amine*, z. B. von Serotonin, vermittelt werden, sollte es möglich sein, auch mit diesen bzw. den Aminosäuren, aus denen sie durch Decarboxylierung im

Organismus entstehen, Hyperglykämie und Hormonverarmung der Nebennieren zu erzielen, und die Wirkung durch Hemmung der Aminoxydase mit Iproniazid zu beeinflussen.

Aus früheren Untersuchungen (Holtz u. Credner) war uns bekannt, daß *Dioxyphenylalanin* (Dopa), das durch die in den verschiedensten Organen — Niere, Leber, Nebennierenmark, sympathischen Nerven und Ganglien — vorkommende Dopadecarboxylase leicht zu *Oxytyramin* decarboxyliert wird, eine Hyperglykämie verursacht. Diese wird aber durch Blockierung der Mono-aminoxydase ebenso wie seine blutdrucksteigernde Wirkung (Balzer u. Holtz) verstärkt (Abb. 3). — Die Abb. 4 zeigt, daß auch *5-Oxytryptophan*, das im Organismus durch Decarboxylierung in *5-Oxytryptamin* (Serotonin) übergehen kann, den Blutzuckerspiegel des Kaninchens erhöht, und daß auch diese Wirkung durch *Iproniazid* verstärkt wird.

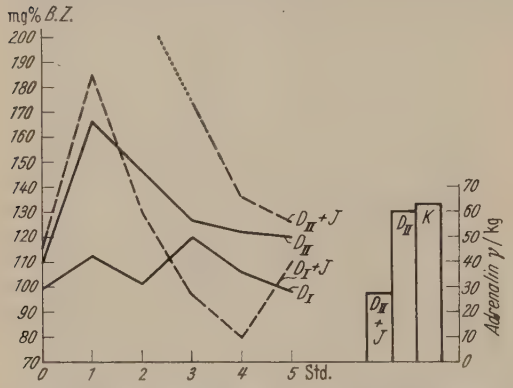


Abb. 3. *Dopahyperglykämie bei Kaninchen nach Iproniazid.* D_I Kaninchen (1,8 kg), 5 mg/kg Dopa i.v., $D_I + J$ Kaninchen (2,3 kg), 5 mg/kg Dopa i.v. 18 Std nach 100 mg/kg Iproniazid i.m., D_{II} Kaninchen (2,4 kg), 10 mg/kg Dopa i.v., $D_{II} + J$ Kaninchen (2,3 kg), 10 mg/kg Dopa i.v. 18 Std nach 100 mg/kg Iproniazid i.m.[1]. *K* Durchschnittlicher Adrenalingehalt der Nebennieren von Kontrolltieren (65 γ/kg Körpergewicht)

[1] In den ersten beiden Stunden war eine Blutentnahme zur Bestimmung des Blutzuckers nicht möglich, da die Ohrgefäße blutleer waren

Untersucht man, wenn der erhöhte Blutzuckerspiegel wieder zur Norm zurückgekehrt ist, die *Nebennieren*, so findet man, daß *Dopa* nur am „Iproniazidtier", nicht am Normaltier mit intakter Aminoxydase, zu einer Abnahme des Adrenalingehaltes geführt hat, während *5-Oxytryptophan* bzw. das aus ihm entstandene Serotonin auch am Normaltier eine deutliche Hormonverarmung verursacht (Abb. 3 und 4). Auch *Serotonin selbst* führt schon bei relativ niedriger Dosierung zu Hyperglykämie und Adrenalinverarmung der Nebennieren, wenn man es *intracisternal* injiziert (Abb. 5).

Der am Normaltier bestehende Unterschied zwischen Dopa und Oxytryptophan findet vielleicht darin seine Erklärung, daß das aus *Dopa* im Organismus entstehende *Oxytyramin* biochemische Vorstufe der Nebennierenmarkhormone ist und dadurch einer Hormonverarmung entgegenwirkt, während das — auch im *Nebennierenmark* unter dem Einfluß der hier vorhandenen Decarboxylase aus *Oxytryptophan* sich bildende (Holtz u. Westermann: Unveröffentlichte Versuche) — *5-Oxytryptamin* (Serotonin) nach Reid und Rand z. B. bei Injektion in die Art. suprarenalis bei

Katzen eine Adrenalinausschüttung bewirkt. Daneben besitzt *Serotonin* als Indolderivat aber auch *zentrale* Wirkungen, die dem Oxytyramin als Brenzkatechinderivat nicht zukommen. So ließ sich in unseren schon erwähnten Untersuchungen an Mäusen die *Evipannarkose* durch *Oxytryptophan* und *Serotonin*, auch durch *Tryptophan* und *Tryptamin*, nicht aber durch *Dopa* und *Oxytyramin* verlängern (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler). Blockierte man bei den Versuchstieren mit Iproniazid die Aminoxydase, so verursachte nicht nur die Injektion der vom *Indol* sich ableitenden Aminosäuren — *Tryptophan*, *Oxytryptophan* —, sondern auch das Brenzkatechinderivat *Dopa* bzw. das aus ihm im Gehirn entstehende *Oxytyramin* Erregungszustände, durch die die Narkosedauer verkürzt oder die Narkose überhaupt verhindert wurde.

Man geht deshalb wohl nicht fehl mit der Annahme, daß die bei durch Iproniazid blockierter Aminoxydase sowohl nach *Tryptophan* und *Oxytryptophan* als nach *Dopa* auftretende *zentrale Erregung*, die bei *Mäusen* die narkotische Wirkung des Evipans verhindert, bei *Kaninchen* Hyperglykämie und Adrenalinverarmung der Nebennieren verursacht. Diese Wirkungen stimmen mit denen des *Reserpins*

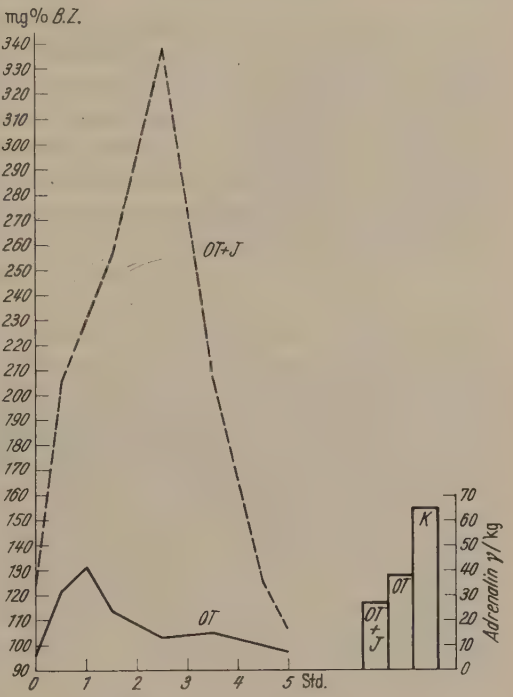


Abb. 4. *Hyperglykämische Wirkung des 5-Oxytryptophans bei Kaninchen vor und nach Iproniazid. OT* Kaninchen (2,9 kg), 5 mg/kg 5-Oxytryptophan i.v., *OT + J* Kaninchen (2,9 kg), 5 mg/kg 5-Oxytryptophan i.v. 15 Std nach 100 mg/kg Iproniazid i.m., *K* Durchschnittlicher Adrenalingehalt der Nebennieren von Kontrolltieren (65 γ/kg Körpergewicht)

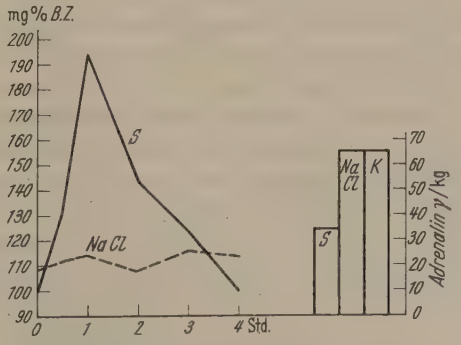


Abb. 5. *Hyperglykämische Wirkung des Serotonins bei suboccipitaler Injektion am Kaninchen. S* Kaninchen (2,3 kg) 500 γ Serotonin in 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung suboccipital, *NaCl* Kaninchen (2,6 kg) 0,1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung suboccipital, *K* Adrenalingehalt der Nebennieren eines Kontrolltieres (65 γ/kg Körpergewicht)

insofern überein, als auch Reserpin, das bei *Mäusen* die Evipannarkose verlängert, das nach Iproniazid nicht mehr tut (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler), und bei *Kaninchen* eine Adrenalinverarmung der Nebennieren verursacht, die sich durch Iproniazid nicht verhindern läßt.

Auch bei *Ratten*, die auf Reserpin viel unempfindlicher reagieren als *Kaninchen*, verursachen *Dopa* und *5-Oxytryptophan* zentrale Erregung und Abnahme des Nebennierenadrenalins, wenn man nach Blockierung der Aminoxydase durch Vorbehandlung mit Iproniazid hohe Dosen (25—50 mg/kg i.v.) verabfolgt (Tab. 3). Hier *unterscheidet* sich aber die Wirkung grundsätzlich von derjenigen des *Reserpins*, indem *Reserpin* bei *Ratten* zwar auch zur Verarmung des Nebennierenmarks an Adrenalin führt, diese aber durch eine Blokkierung der Aminoxydase mit Iproniazid vollständig verhindert wird (vgl. Abb. 1 und Tab. 3).

Tabelle 3. *Adrenalingehalt der Nebennieren von Ratten nach Dopa, 5-Oxytryptophan und Insulin*

Gruppen von je 3 Ratten (180—220 g). *Dopa:* 50 mg/kg i.v. *5-Oxytryptophan:* 25 mg/kg i.v. *Insulin:* 10 E/kg s.c. + J: 100 mg/kg Iproniazid 15 Std vorher. Adrenalingehalt der Nebennieren in γ/kg Körpergewicht 4—7 Std nach Injektion der Aminosäuren bzw. des Insulins

	—	+ J	Versuchsdauer Std
Kontrollen . . .	104	116	—
5-Oxytryptophan	119	61	4
Dopa	120	57	4
Kontrollen . . .	121	132	—
Insulin.	60	78	4
Insulin.	88	61	7

Die bei „Iproniazid-Ratten" nach Injektion hoher Dosen von Dopa und Oxytryptophan zustande kommende, mit zentraler Erregung einhergehende und von der *Reserpin*-Wirkung dem Mechanismus nach prinzipiell verschiedene Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks stimmt mit der Wirkung des *Insulins* überein, da auch die durch *Insulin* verursachte Abnahme des Adrenalingehaltes sich durch Iproniazid *nicht* verhindern läßt (Tab. 3).

Der bei *Kaninchen* schon nach kleinen, bei *Ratten* erst nach großen *Reserpin*-Dosen zustande kommenden Adrenalinverarmung der Nebennieren muß deshalb ein verschiedener Mechanismus zugrunde liegen: alles spricht dafür, daß es sich bei *Kaninchen* überwiegend um eine *zentral* bedingte *Hypersekretion*, bei *Ratten* überwiegend um eine *peripher* bedingte *Freisetzung* der Nebennierenmarkhormone handelt.

Diskussion

Die *hohe* Empfindlichkeit von *Kaninchen* und die *geringe* Empfindlichkeit von *Ratten* gegenüber der zu Adrenalinverarmung des Nebennierenmarks führenden *Reserpin*-Wirkung findet eine Parallele in der hohen bzw. geringen Empfindlichkeit der beiden Tierarten gegenüber der

hypo-glykämischen und bei hoher Dosierung auch eine Adrenalinverarmung der Nebennieren verursachenden Wirkung des *Insulins*. Die Insulinwirkung auf die Nebennieren ist wenigstens überwiegend *zentralnerval* bedingt: das Absinken des Blutzuckerspiegels ist für bestimmte Regulationszentren des Kohlehydratstoffwechsels der adäquate Reiz, auf dem Wege der Nn. splanchnici vermehrt Impulse zum Nebennierenmark zu entsenden und dieses zu einer vermehrten Abgabe, d. h. einer *echten Mehrsekretion* von Adrenalin zu veranlassen, wie sie auch z. B. bei einer *mechanischen* Reizung („Piqûre") des am Boden des vierten Ventrikels gelegenen „Zuckerzentrums" zustande kommt.

Demgegenüber besteht das Wesen der *Reserpin*-Wirkung darin, die *Bindungsfähigkeit* der Zellen und Gewebe für biogene Amine aufzuheben und diese dadurch *„freizusetzen"*. Im Rahmen unserer Untersuchungen sind 2 Stellen im Organismus von besonderem Interesse, an denen diese „Freisetzung" erfolgt: das *Gehirn*, das unter der Reserpinwirkung an *Serotonin* und *„Sympathin"* verarmt, und das *Nebennierenmark*, das an *Adrenalin* verarmt. Die durch Reserpin verursachte Verarmung des *Gehirns* an *Serotonin* kommt offenbar nicht dadurch zustande, daß das „freigesetzte" Amin durch die Körpersäfte (Blut, Liquor) abtransportiert wird, sondern dadurch, daß es von der *Mono-aminoxydase* durch oxydative Desaminierung abgebaut wird. Blockiert man nämlich das abbauende Ferment durch Iproniazid, so bleibt die sonst nach Reserpin erfolgende Verarmung an Serotonin aus, und der Serotoningehalt des Gehirns kann sogar über die Norm erhöht sein. Trotzdem ist das durch Reserpin „freigesetzte" und durch Iproniazid vor dem inaktivierenden Abbau geschützte Serotonin als „freies" Amin *pharmakologisch* wirksam geworden: die „sedative" und die Evipannarkose verlängernde Wirkung des Reserpins läßt sich bei Mäusen durch Vorbehandlung der Tiere mit Iproniazid verhindern, wie wir in einer voraufgegangenen Arbeit zeigen konnten. Das Bild der Reserpinwirkung bei „Iproniazidtieren" besitzt deutliche Züge zentraler Erregung — Piloerektion, Mydriasis —, die auf Grund elektrophysiologischer Untersuchungen (siehe z. B. Rinaldi u. Himwich; Gangloff u. Monnier; Sailer u. Stumpf) u. a. den *ascendierenden* Anteil der Formatio reticularis — die Region von Bulbus und Tegmentum — betrifft, bei deren Stimulierung es zur sogenannten *„arousal reaction"* kommt (Moruzzi u. Magoun).

Bei „empfindlichen", sensiblen Tieren wie *Kaninchen* führt diese Erregungskomponente der Reserpinwirkung dann offensichtlich auch zur Stimulierung des *descendierenden* Anteils des retikulären Systems, die ähnlich wie Hypoglykämie (Insulin) und Piqûre das Nebennierenmark via Splanchnicus zu langanhaltender Mehrsekretion von Adrenalin veranlaßt, so daß es schließlich zu einer excessiven Hormonverarmung des Organs kommt. Diese nerval bedingte, zur Hormonverarmung

führende *Hypersekretion* beim Kaninchen wird durch Iproniazid *nicht* verhindert.

Bei wenig „empfindlichen" Tieren wie *Ratten*, bei denen selbst 10—20fach höhere Reserpindosen als bei *Kaninchen* nicht zur *totalen* Adrenalinverarmung der Nebennieren führen, den Adrenalingehalt nur um etwa 50% vermindern, spielt der zentral-nervale, durch eine echte *Mehrsekretion* wirkende Mechanismus anscheinend nur eine untergeordnete Rolle. Hier kommt die Adrenalinverarmung der Nebennieren offensichtlich ganz überwiegend, wenn nicht ausschließlich dadurch zustande, daß — wie in anderen Zellen und Geweben des Körpers: Thrombocyten, Darm, Milz und Gehirn — so auch in den *chromaffinen* Zellen des *Nebennierenmarks* die Bindungsfähigkeit für die Katecholamine durch Reserpin aufgehoben ist, so daß diese wie das Serotonin und Sympathin des Gehirns „*freigesetzt*" — aber nicht *sezerniert* — und damit dem Abbau durch die Aminoxydase zugänglich werden. Die Blockierung des Fermentes mit Iproniazid „*konserviert*" deshalb die freigesetzten Amine und bewahrt auf diese Weise ähnlich wie das *Gehirn* vor einer Verarmung an *Serotonin*, so das *Nebennierenmark* vor der Verarmung an *Adrenalin*.

Diese Auffassung findet eine Bestätigung darin, daß auch bei *Ratten* eine *zentral* ausgelöste, durch echte *Hypersekretion* verursachte Hormonverarmung des Nebennierenmarks, wie sie nach hohen *Insulin*-Dosen auftritt, durch Hemmung der Mono-aminoxydase mit Iproniazid *nicht* verhindert wird; ferner darin, daß — wie Kroneberg u. Schümann in der vorstehenden Arbeit zeigen —, die totale nervale Ausschaltung der Nebennieren durch Rückenmarkdurchschneidung in Höhe von C_6 die Reserpinwirkung auf das Nebennierenmark bei *Kaninchen* verhindert, bei *Ratten* jedoch unbeeinflußt läßt.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Brenzkatechinamine in granulären Elementen der chromaffinen Zellen gespeichert und hier wahrscheinlich an spezifische Anionen gebunden sind (Welch u. Blaschko; Hillarp, Lagerstedt u. Nilson; Schümann). Der hohe Gehalt der Granula an *Adenosintriphosphat* (ATP) — 5—10% des Trockengewichtes (Högberg, Hillarp u. Nilson; Blaschko u. Mitarb.) — könnte dafür sprechen, daß dieses hier nicht nur *katalytische* Funktionen, z. B. bei der Methylierung von Noradrenalin, ausübt, sondern als Anion mit 3—4 negativen Ladungen an der *Bindung* der Amine beteiligt ist —, ähnlich wie in den *histamin*-reichen Mastzellen das *Heparin*. Der von uns betonte Unterschied zwischen „*Freisetzung*" (Reserpin) und „*Sekretion*" (Insulin) von Adrenalin in den chromaffinen Zellen — im einen Fall ließ sich die zustande kommende Hormonverarmung durch Blockierung der Aminoxydase verhindern, im anderen nicht — muß dadurch bedingt sein, daß den beiden Vorgängen, dem der „Freisetzung" und dem der „Sekretion", ein verschiedener Mechanismus zugrunde liegt. Bei der durch Insulin verursachten Hormonverarmung der adrenalinhaltigen Granula der chromaffinen Zellen, die durch eine vermehrte „*Sekretion*" zustande kommt, soll auch der ATP-Gehalt abnehmen, so daß der Quotient Adrenalin/ATP unverändert bleibt [Carlsson u. Hillarp (2)]. Eine im stöchiometrischen Verhältnis erfolgende

Abgabe von Adrenalin und ATP bei der physiologischen Sekretion könnte den Sinn haben, das Amin, das hormonale Wirkungen ausüben soll, dadurch vor der Zerstörung durch die in den Mitochondrien der chromaffinen Zelle gespeicherte Aminoxydase zu schützen. Es ist dann verständlich, daß die durch eine *Hypersekretion* nerval über den N. splanchnicus erfolgende Hormonverarmung (Insulin, Reserpin bei Kaninchen) sich durch Hemmung der Aminoxydase mit Iproniazid *nicht* verhindern läßt. Da die bei der *Ratte* nach Reserpin durch „*Freisetzung*" von Adrenalin zustande kommende Hormonverarmung sich durch Blockierung der Aminoxydase mit Iproniazid verhindern läßt, muß das „freigesetzte" Adrenalin im Gegensatz zum „sezernierten" durch die Aminoxydase angreifbar sein.

Summary

1. In *rats reserpine* depletes the *brain* of *serotonin* and the *suprarenal medulla* of *adrenaline*. This depletion can be prevented by inhibiting the mono-aminoxydase with iproniacid (isopropylisonicotinylhydracid). In *rabbits*, however, the depletion of the suprarenals is not prevented by iproniacid.

2. In *rabbits intracisternal* injection of *serotonin* causes hyperglycemia and a depletion of the adrenal medulla. The same result was obtained after *intravenous* injection of *5-hydroxytryptophane* which in the body is decarboxylated to serotonin. These effects are *potentiated* by iproniacid. After pretreatment with iproniacid not only 5-hydroxytryptophane, but also *3,4-dihydroxy-phenylalanine* (dopa) will cause central excitation and a depletion of the suprarenal medulla of adrenaline.

3. Whereas in rats iprocianid prevents the adrenaline depletion of the suprarenals produced by *reserpine*, it is ineffective against a depletion caused by *insuline*.

4. It is assumed that in *rabbits* the action of reserpine upon the suprarenals is mainly a *central* effect: Serotonin and sympathin are liberated in the brain and might stimulate not only the *ascending* reticular system in the midbrain („arousal reaction") but also the *descending* reticular system. By mediation of the splanchnic nerves, this causes a „*true hormonal hypersecretion*" of the suprarenal medulla resulting in a depletion of adrenaline comparable to that occuring after insuline. In this case, the action of both reserpine and insuline are *not* prevented by iproniacid.

5. It is assumed that in *rats* the action of reserpine upon the suprarenals is mainly a *peripheral* effect: The *alkaloid itself* might deplete the suprarenals by abolishing the ability of the medullar chromaffine cells to preserve the adrenaline which is then destroyed by the aminooxydase. This would correspond to the mechanism which accounts for the depletion of other cells and tissues of their content of biogenic amines. In these cases, depletion of the tissue stores is prevented by iproniacid.

6. The results summarized in the last two paragraphs suggest that there may be two different mechanisms leading to a depletion of the

suprarenals of adrenaline: a) nervous impulses leading to an *active secretion* into the blood; b) *release* of the adrenaline from its bound form making it accessible to oxydative destruction by a direct action on the chromaffine cells.

Fräulein Gisela Thielecke danken wir wiederum für ihre verständnisvolle Mitarbeit.

Literatur

Amin, A. H., T. B. B. Crawford and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **126**, 596 (1954). — Balzer, H., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 547 (1956). — Blaschkoe, H., G. V. R. Born, A. D'Jorio and N. R. Eade: J. of Physiol. **133**, 548 (1956). — Brodie, B. B., A. Pletscher and P. A. Shore: J. of Pharmacol. a. Exper. Ther. **116**, 9. u. 46 (1956). — Science (Lancaster, Pa.) **122**, 968 (1955); **123**, 992 (1956). — Nature (Lond.) **175**, 1133 (1955). — Carlsson, A., u. N. A. Hillarp (1): Kungl. Fysiografiska Sällskapets i. Lund Förhandl. **26**, Nr. 8 (1956). — (2) Acta physiol. scand. (Stockh.) **37**, 235 (1956). — Euler, U. S. v., u. U. Hamberg: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 561 (1949). — Euler, U. S. v., u. J. Floding: Acta physiol. scand. (Stockh.) **33**, Suppl. **118**, 45 (1955). — Gaddum, J. H., and M. Vogt: Brit. J. Pharmacol. **11**, 175 (1956). — Gangloff, H., and M. Monnier: Helvet. physiol. Acta **15**, 83 (1957). — Hillarp, N. A., S. Lagerstedt and B. Nilson: Acta physiol. scand. (Stockh.) **28**, 251 (1953); **31**, Suppl. 113, 79 (1954). — Högberg, B., N. A. Hillarp and B. Nilson: Congrès Internat. de Biochimie, Résumé des communic. **1955**, 72. — Holtz, P., u. K. Credner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 356 (1942). — Holtz, P., H. Balzer, E. Westermann u. E. Wezler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. im Druck (1957). — Holzbauer, M., and M. Vogt: J. of Neur. N. S. **1**, 8 (1956). — Kuschke, H. J., u. J. Frantz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 269 (1955). — Kroneberg, G., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. im Druck (1957). — Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. I, 455 (1949). — Reid, G., and M. Rand: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **29**, 401 (1951). — Rinaldi, F., and H. E. Himwich: Arch. of Neur. **73**, 387 (1955). — Ann. New York Acad. Sci. **61**, 27 (1955). — Sailer, S., u. Ch. Stumpf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 378 (1957). — Schümann, H. J.: J. of Physiol. **137**, 318 (1957). — Siekevitz, P., and V. R. Potter: J. of Biol. Chem. **200**, 187 (1953). — Vogt, M., and M. K. Paasonen: J. of Physiol. **131**, 617 (1956). — Welch, A. D., and H. Blaschko: Federat. Proc. **12**, 380 (1953).

Professor Dr. P. Holtz, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Straße 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 373—377 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über das Vorkommen von Oxytyramin in der Nebenniere

Von
H. Dengler

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Die Biogenese der Sympathicusstoffe erfolgt mit aller Wahrscheinlichkeit über *Dopa* und *Oxytyramin*. Dafür spricht u. a. das Vorkommen der Dopadecarboxylase nicht nur in parenchymatösen Organen (Niere, Leber), sondern auch im Nebennierenmark (Langemann; Holtz u. Bachmann; Westermann) und in sympathischen Nerven und Ganglien [Holtz u. Westermann (1)]. Der Nachweis einer Dopadecarboxylaseaktivität allein ist aber noch kein Beweis dafür, daß die Bildung der Sympathicusstoffe tatsächlich über Oxytyramin als Zwischenprodukt erfolgt, da das Ferment auch *Dioxyphenylserin* direkt zu Noradrenalin zu decarboxylieren vermag (Blaschko u. Mitarb.; Werle u. Jüntgen-Sell; Holtz u. Westermann (2)]. Der Nachweis von Oxytyramin wäre deshalb von Bedeutung für die Erhärtung des über eine Decarboxylierung von *Dopa* verlaufenden Syntheseweges.

Oxytyramin wurde bisher nur im Nebennierenmark von Schafen (Goodall) und Rindern (Shepherd u. West) nachgewiesen. Der Nachweis wurde mit papierchromatographischer Methodik geführt. Auch das vereinzelte Vorkommen von Oxytyramin in Phäochromocytomen (Manger u. Mitarb.; Weil-Malherbe; McMillan) stützt sich lediglich auf den papierchromatographischen Nachweis. Das gilt auch für den Nachweis von Oxytyramin in sympathischen Nerven und Ganglien (Schümann), der allerdings durch die Austestung der Eluate am Blutdruck gestützt wurde.

Um eine weitere Charakterisierung und Identifizierung des als Oxytyramin angesprochenen Katecholamins zu ermöglichen, haben wir versucht, Oxytyramin aus Nebennieren mit Hilfe der Säulenchromatographie und Gegenstromverteilung in größerer Menge rein darzustellen.

Methodik

Saure alkoholische Extrakte aus Gesamtnebennieren frisch geschlachteter, ausgewachsener Schafe (1 ml 2n H_2SO_4 auf 100 ml 96% Äthanol) wurden im Vakuum unter N_2 eingeengt, zur Entfernung der Lipoide mit $CaCl_2$-gesättigtem Aceton versetzt und nach Verjagen des Acetons mit Petroläther ausgeschüttelt. Die wäßrige

Phase wurde im Vakuum unter N_2 fast zur Trockne gebracht und in dem zur Säulenchromatographie benutzten Solvens aufgenommen. Ausbeute: 1,3 mg Gesamtkatechole pro 1 g Nebenniere.

Zur Vortrennung der Katechole diente eine Cellulosesäule von 47 cm Länge und 3 cm Durchmesser. Als Träger wurde das Cellulosepulver 123a der Firma Sch. & Sch. benutzt[1]. Solvens: obere Phase eines Gemisches von n-Butanol-Ameisensäure (85%) — H_2O = 5:1:4. Die Säule war mit 270 mg Gesamtkatecholen beladen. Durchfluß 6—8 ml/Std, Volumen der Fraktionen 4 ml. In jedem 4. bzw. 2. Röhrchen wurden bei p_H 6,0 die Katechole nach v. Euler u. Hamberg bestimmt. Nach

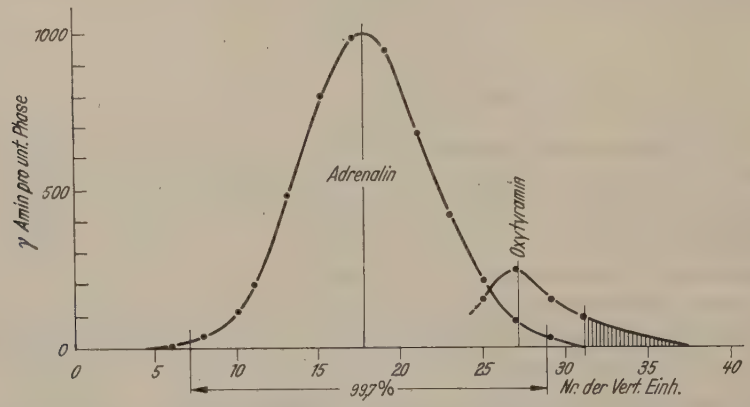


Abb. 1. *Diagramm zur Gegenstromverteilung. Abszisse*: Nr. der Verteilungseinheiten. *Ordinate:* Gehalt an Adrenalin bzw. Oxytyramin in den unteren Phasen der einzelnen Verteilungseinheiten. — 99,7% des gesamten Adrenalins sind in den durch Pfeil gekennzeichneten Einheiten enthalten. Die in den „Ergebnissen" näher beschriebenen Reaktionen zur Identifizierung wurden mit den praktisch reines Oxytyramin enthaltenden, schraffiert gezeichneten Fraktionen 32—37 ausgeführt

einem Durchfluß von 926 ml begannen die Katechole auszutreten. Die papierchromatographische Untersuchung der einzelnen Fraktionen ergab, daß zuerst — wie wir auch in Versuchen an einer Testsäule feststellten — Oxytyramin, gefolgt von Adrenalin und Noradrenalin austritt.

Die die Hauptmenge des Oxytyramins enthaltenden Fraktionen, die daneben noch Adrenalin, jedoch kein Noradrenalin enthielten, wurden vereinigt und nach Abdestillation des Lösungsmittels der Gegenstromverteilung unterworfen. Da Oxytyramin sich bei der Oxydation mit Jod ähnlich wie Noradrenalin verhält (Oxydation bei p_H 6 zu 83%, vollständige Oxydation erst bei p_H 6,5), ist beim Fehlen von Noradrenalin in einem Adrenalin-Oxytyramingemisch die Differenzierung möglich. Diese ergab 14,4 mg Adrenalin und 1,6 mg Oxytyramin.

Gegenstromverteilung (Abb. 1): 104stufige Verteilung in einer Craigschen Glasapparatur. Phasensystem: n-Butanol — n-Propanol (4:1)/0,2n HCl mit 0,1% NaCl. Phasenverhältnis 15 ml Ober- / 10 ml Unterphase. Temperatur: 19° C ± 0,5°.

Nach vollendeter Verteilung wurden in aliquoten Teilen der unteren Phase in den einzelnen Verteilungseinheiten die Katechole wie oben mit Jod colorimetrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurden aliquote Teile papierchromatographiert und der Oxytyramingehalt aus der planimetrisch gemessenen Fleckengröße an Hand einer

[1] Vorbehandlung: 1 Std Auskochen mit n/5 HCl — mit H_2O waschen — Extraktion mit heißem Butanol — Waschen mit Aceton und H_2O — Trocknen bei 105° C — Vermahlen im Multimix.

Eichkurve ermittelt, die einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der aufgetragenen Aminmenge und der Fleckengröße in Quadratzentimetern ergibt.

Bemerkungen zur Gegenstromverteilung. Für Adrenalin wurde bei der Probeverteilung im Scheideröhrchen im später benutzten Phasensystem ein Verteilungskoeffizient von Vk = 0,12 bestimmt. Bei einem Phasenverhältnis von 1,50 entspricht dem eine Verteilungszahl G = 0,19. Damit stimmen die nach erfolgter Verteilung aus der Lage des Maximums und aus dem Gehalt benachbarter Fraktionen berechneten Werte von G = 0,21 bzw. 0,20 und 0,21 mit hinreichender Genauigkeit überein.

Für Oxytyramin wurde im Verteilungsversuch eine Verteilungszahl G = 0,45 gefunden, während sich aus dem Maximum der Verteilungskurve ein Wert von G = 0,28 berechnete. Diese Diskrepanz dürfte ihre Erklärung in einer — auch bei der Probeverteilung nachweisbaren — Erniedrigung des Verteilungskoeffizienten von Oxytyramin in Gegenwart größerer Adrenalinmengen finden.

Ergebnisse

Bei der in der Methodik geschilderten Aufarbeitung ergab die differenzierende colorimetrische Bestimmung nach säulenchromatographischer Auftrennung einen Anteil von etwa 2 % Oxytyramin an den Gesamtkatecholen.

Zur näheren Charakterisierung der als Oxytyramin angesehenen Substanz wurden mit den Fraktionen der Gegenstromverteilung (s. Abb. 1), die keine colorimetrisch und papierchromatographisch nachweisbaren Adrenalinmengen enthielten, folgende Reaktionen ausgeführt:

1. *Papierchromatographisches Verhalten.* Die Substanz zeigt gleiche R_f-Werte wie synthetisches Oxytyramin in den Systemen: Phenol — HCl (15% n/10 HCl) und n-Butanol gesättigt mit n/1 HCl. Auch in dem Solvens n-Butanol — Ameisensäure — H_2O = 50 : 10 : 40 fanden wir gleiches Verhalten. Die durch Ferricyankali oder Kaliumjodat sichtbar gemachten Flecken stimmten mit denen reinen Oxytyramins auch in Farbton und UV-Fluorescenz überein.

2. *Reaktion mit Dikaliumquecksilbertetrarhodanid.* Die Substanz gibt Rotfärbung mit Dikaliumquecksilbertetrarhodanid. Dieses von Salgó (7) angegebene Reagens soll für Adrenalin spezifisch sein. Wir fanden positiven Reaktionsausfall jedoch bei allen 3,4-Dioxyphenyläthylaminen, unbeschadet der Substitution am α- oder β-C-Atom der Seitenkette.

3. Zur Charakterisierung als *primäres Amin* benutzten wir die Reaktion mit Dichlor-fluorescein (Feigl). Dabei trat die für primäre Amine charakteristische gelb-grüne Fluorescenz auf. Sekundäre Amine, z. B. Adrenalin, geben im Gegensatz dazu eine Rotfluorescenz. — Das Reagens wurde nach der von A.v. Bayer angegebenen Methode hergestellt.

4. Um festzustellen, ob die Substanz am β-C-Atom der Seitenkette eine Hydroxylgruppe trägt, machten wir uns die Fähigkeit dieser Gruppe zur Ätherbildung zunutze. Wie Serlin zeigen konnte, entstehen in Adrenalin- und Noradrenalinlösungen bereits beim Einengen in

Salzsäure-Alkohol bei Zimmertemperatur die entsprechenden Äthyläther in kleinen Mengen. Läßt man 20%ige äthanolische Salzsäure bei 70°C auf die Amine einwirken, so liegt nach 1 Std der größte Teil in verätherter Form vor. — Unterwirft man die aus Nebennieren isolierte Oxytyraminfraktion dieser Behandlung, so tritt ebensowenig wie bei synthetischem Oxytyramin im Papierchromatogramm eine neue Komponente auf, die für die Bildung eines Äthyläthers sprechen würde (Abb. 2).

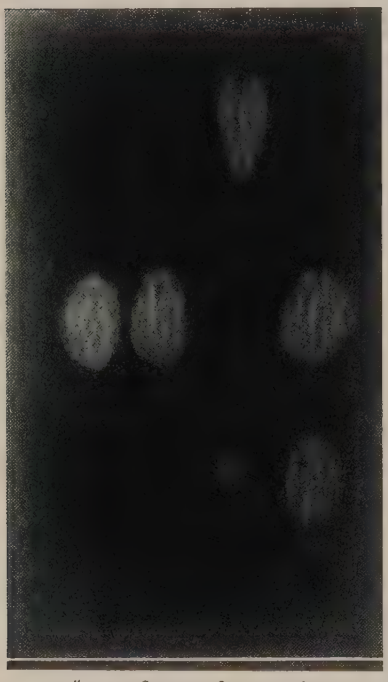


Abb. 2. *Papierchromatogramm.* (Schl. & Sch. 2043a. Phenol/HCl, N_2-Atmosphäre, ascendierend. Entwicklung der Flecke mit Ferricyankali-Kontaktabzug.) *1* Noradrenalin, R_f 0,31 (25 γ) und Oxytyramin, R_f 0,48 (25 γ). *2* Noradrenalin nach 1stündiger Behandlung mit äthanolischer HCl bei 70° C. Die aufgetragene Menge entsprach vor der Reaktion 25 γ Noradrenalin. R_f-Wert des Äthers 0,60. *3* Oxytyramin (25 γ), wie unter *2* behandelt. *4* Probe aus der Oxytyramin-Fraktion der Gegenstromverteilung, wie unter *2* behandelt

5. *Biologische Austestung. Oxytyramin* verursacht am Kaninchen in einem bestimmten Dosierungsbereich eine charakteristische Blutdrucksenkung (Holtz u. Credner), während *Adrenalin* bei jeder Dosierung blutdrucksteigernd wirkt. Bei der Austestung der Substanz am Kaninchen ging der Blutdrucksenkung eine kurze initiale Steigerung voraus, die ihre Ursache offensichtlich in einer etwa 1%igen Verunreinigung mit Adrenalin hat. Diese wirkt sich bei der hohen benötigten Dosis (100—150 γ Oxytyramin) und der großen Wirkungsverschiedenheit beider Amine biologisch aus.

Bemerkungen zu den Ergebnissen. Der prozentuale Anteil des Oxytyramins an den Gesamtkatecholaminen des *Nebennierenmarks* des Schafes beträgt nach unseren Befunden nur etwa 2%. Dem steht der weit höhere, fast 50% betragende Anteil des Amins im *Nervengewebe* (Milznerven, sympathische Ganglien) gegenüber (Schümann). Dieser Befund ist vielleicht von besonderem Interesse unter dem Gesichtspunkt, daß im Nebennierenmark *Adrenalin*, im Nerven dagegen *Nor-adrenalin* das quantitativ überwiegende und funktionell wichtigste Katecholamin ist.

Zusammenfassung

Bei der präparativen Aufarbeitung von Gesamtnebennieren (Mark und Rinde) ausgewachsener Schafe ließ sich mit Hilfe von Säulenchromatographie und Gegenstromverteilung *Oxytyramin* in solchen Mengen darstellen, die mit Hilfe charakteristischer chemischer Reaktionen eine Identifizierung der Substanz erlaubten. Der Anteil an den Gesamtkatecholaminen betrug etwa 2%.

Literatur

Bayer, A. v.: Justus Liebigs Ann. Chem. **183**, 18 (1876). — Blaschko, H., u. Mitarb.: J. of Physiol. **108**, 427 (1949); **110**, 482 (1950). — Brit. J. Pharmacol. **5**, 431 (1950). — Euler, U. S. v., u. U. Hamberg: Acta physiol. Scand. (Stockh.) **19**, 74 (1949). — Feigl, F.: Spot Tests, Elseviers Publishing Company 1954. — McGoodall, C.: Acta chem. scand. (Copenh.) **4**, 550 (1950). — Holtz, P., u. F. Bachmann: Naturwissenschaften **39**, 116 (1952). — Holtz, P., u. K. Credner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 356 (1942). — Holtz, P., u. E. Westermann (1): Naturwissenschaften **42**, 647 (1955); **43**, 37 (1956). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 538 (1956). — Holtz, P., u. E. Westermann (2): Biochem. Z. **327**, 502 (1956). — Langemann, H.: Brit. J. Pharmacol **6**, 318 (1951). — Manger, W. M., u. Mitarb.: Circulation (New York) **10**, 641 (1954). — McMillan, M.: Lancet **1956**, II, 282. — Salgó, E.: Z. anal. Chem. **138**, 101 (1953). — Serlin, I., and M. Goldenburg: Biochemic. J. **54**, 483 (1953). — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 566 (1956). — Shepherd, D. M., and G. B. West: J. of Physiol. **120**, 15 (1953). — Weil-Malherbe, H.: Lancet **1956**, II, 284. — Werle, E., u. J. Jüntgen-Sell: Biochem. Z. **327**, 259 (1955). — Westermann, E.: Biochem. Z. **328**, 405 (1957).

Dr. H. Dengler, Medizinische Klinik der Univ. Heidelberg

Arch. exp. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 378—387 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Resistenz einiger Wirkungen peripherer Vagusreizung gegenüber Ganglienblockern*

Von
W. Schaumann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Sympathische autonome Nervenfasern werden meist bald nach ihrem Austritt aus dem ZNS vom prä- auf das postganglionäre Neuron umgeschaltet. Die parasympathischen Umschaltstellen dagegen liegen in unmittelbarer Nähe des Erfolgsorganes oder in diesem selbst. Durch prä- und postganglionäre Reizung läßt sich eine Hemmung der Reizübertragung in sympathischen Ganglien leicht feststellen, was im Bereich des Parasympathicus auf diese Weise nur beim Ganglion ciliare gelungen ist (Whitteridge; Perry u. Talesnik). Die Funktion parasympathischer Ganglien wird meist geprüft, indem man die Wirkung eines Nervenreizes mit der von Acetylcholin vergleicht. In der Regel hemmen Ganglienblocker z. B. die Wirkung eines peripheren Vagusreizes, während die von intravenös oder intraarteriell injiziertem Acetylcholin noch erhalten ist.

Im folgenden werden zwei Ausnahmen von dieser Regel beschrieben: Beim *Meerschweinchen* wird die *Bronchokonstriktion*, und bei der *Katze* werden *Magenkontraktionen* nach Vagusreiz durch Ganglienblocker nicht aufgehoben.

Methoden

Meerschweinchen und Ratten wurden mit Urethan, Katzen mit 50 mg/kg Chloralose + 250 mg/kg Urethan narkotisiert.

Magenbewegungen wurden entweder über einen Ballon im Magen registriert, oder es wurde ein Schlauch in den Magen eingeführt, der Oesophagus unterbunden und der Magen mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllt. In beiden Fällen wurden die Volumschwankungen auf eine Mareysche Kapsel übertragen.

Das *Brochialvolumen* wurde nach der Methode von Konzett u. Rössler gemessen, wenn nicht anders erwähnt bei eröffnetem Thorax. In den Versuchen an Meerschweinchen wurden die spontanen Atembewegungen unabhängig von der künstlichen Beatmung durch einen am Thorax befestigten Faden auf einen Hebel mit Stirnschreiber übertragen. Bei der Inspiration erfolgte ein Ausschlag nach unten.

Der *Blutdruck* wurde in der art. carotis gemessen. Zur i.v. Injektion wurde ein Polyäthylenschlauch in eine vena jugularis eingeführt und so weit vorgeschoben, daß

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

die Spitze in Herznähe lag. Beide Vagi wurden durchtrennt und der periphere Stumpf des einen mit Rechteckimpulsen von maximaler Intensität gereizt.

Die *isolierte Lunge* wurde nach der Methode von Delaunois u. King von der art. pulmonalis aus perfundiert und mit Unterdruck beatmet. Trotz Beachtung aller angegebenen Vorsichtsmaßnahmen trat in vielen Fällen eine spontane Bronchoconstriction auf. Durch Zusatz von Adrenalin 10^{-7} + Ascorbinsäure 10^{-5} konnte dies teilweise vermieden werden. Während es mit dieser Methode gelang, durch Injektion von Pharmaka in die Perfusionsflüssigkeit über lange Zeit reproduzierbare Kontraktionen der Bronchialmuskulatur zu erhalten, war ein *Vagusreiz* nur während der ersten 20 min wirksam. Durch folgende Modifikation gelang es jedoch, den Vagus funktionstüchtig zu erhalten: Durch den Deckel des Unterdruckgefäßes wurde ein dünner Kunststoffschlauch eingeführt, der einen Strom von Sauerstoff-Kohlensäuregemisch und Tyrode-Lösung auf die Elektroden mit den Vagi sprühte. Die Tyrode-Lösung vermischte sich mit der ausfließenden Perfusionsflüssigkeit, deren Menge nicht bestimmt wurde. Dagegen wurde, wie schon von Alberty angegeben, der zur Beatmung des Präparates notwendige Unterdruck mitregistriert.

Folgende *Pharmaka* wurden verwendet: *Acetylcholinchlorid*, *Hexamethoniumbromid*[1], N,N,N′,N′-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-azapenthylen-1,5-diammoniumdibromid (*Pendiomid*), *Tetraäthylammoniumbromid* (TEA), *Atropinsulfat*, *Eserinsalicylat*, *Prostigminsulfat*, Pyrrolidyl-äthyl-phenyl-benzylamin (*Luvistin*), 2-(N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin-Methansulfonat (*Regitin*) und *Lysergsäure-diäthylamid* (LSD). Alle Angaben beziehen sich auf die Salze.

Ergebnisse

Im Versuch der Abb. 1 wurden bei einem *Meerschweinchen* die Veränderungen von Blutdruck sowie Magen- und Bronchialvolumen nach Reizung des peripheren Vagusstumpfes und nach i.v. Injektion von Acetylcholin aufgezeichnet. Da im folgenden vor allem das Verhalten der bronchoconstrictorischen Wirkung des Acetylcholins mit der eines Vagusreizes verglichen werden soll, wurde die Dosis von Acetylcholin so gewählt, daß sie eine etwa gleich starke Bronchokonstriktion auslöste wie der Vagusreiz. Der Blutdruck fiel dabei nach Acetylcholin wesentlich stärker ab, während am Magen nur der Vagusreiz eine Kontraktion auslöste (Abb. 1 a).

Nach Gabe von 9 mg/kg *Hexamethonium* — das ist ein Vielfaches der Schwellendosis, die beim Meerschweinchen für eine Blockade der Ganglienzellen ausreicht — war die Bronchokonstriktion nach Acetylcholin verstärkt. Eine Senkung des Blutdruckes war kaum mehr zu beobachten, da dieser durch das Hexamethonium schon stark erniedrigt war; die Bradykardie war aber nach wie vor vorhanden. Der elektrische *Vagusreiz* war am Herzen erwartungsgemäß unwirksam. Er löste auch keine Magenkontraktionen mehr aus, sondern im Gegenteil eine leichte Erschlaffung, die nach den Befunden von Greeff u. Holtz auf die Wirkung sympathischer Fasern zurückzuführen ist. Um so erstaunlicher war es, daß der

[1] Den Aschaffenburger Zellstoffwerken „Pharmazell" danke ich für die Überlassung der Versuchsmengen von Hexamethonium.

Vagusreiz noch immer eine *Bronchokonstriktion* verursachte, die ähnlich wie die nach Acetylcholin sogar stärker war als vor Hexamethonium (Abb. 1 b). Auch die zusätzliche Gabe von 5 mg/kg *Pendiomid* konnte die Bronchokonstriktion nach Vagusreiz nicht verhindern (Abb. 1 c). *Tetraäthylammonium* war in anderen Versuchen ebenfalls unwirksam.

Man kann nach diesen Ergebnissen wohl verallgemeinernd sagen, daß die Bronchokonstriktion nach Vagusreiz sich beim Meerschweinchen durch

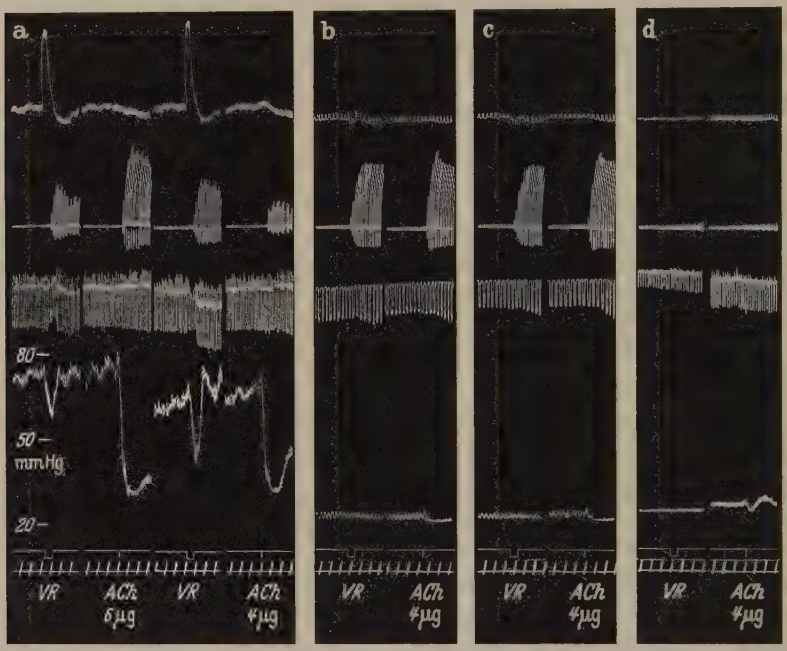


Abb. 1. *Resistenz der durch Vagusreiz ausgelösten Bronchokonstriktion gegen Ganglienblocker.* — *Meerschweinchen*, 600 g, bivagotomiert, Thorax eröffnet. Bei *VR* peripherer Stumpf des rechten Vagus gereizt mit 10 Milliamp., 1 msec, 10 Imp/sec, 10 sec lang. Bei *ACh* 4 bzw. 6 µg Acetylcholin i.v. Von oben nach unten: Magenkontraktionen (Magen mit physiol. NaCl gefüllt); Bronchialvolumen; Atembewegungen; Blutdruck; Reizmarkierung; Zeit in 15 sec. Nach (*a*) 9 mg/kg Hexamethonium; nach (*b*) 5 mg/kg Pendiomid; nach (*c*) 0,1 mg/kg Atropin

Ganglienblocker nicht hemmen läßt. 0,1 mg/kg *Atropin* schaltete die bronchokonstriktorische Wirkung von Acetylcholin und die des Vagusreizes aus (Abb. 1 d). Das Antihistaminicum *Luvistin* (5 mg/kg), das Sympathicolyticum *Regitin* (10 mg/kg) und *LSD* (0,04 mg/kg) konnten die Bronchokonstriktion nach Vagusreiz nicht verhindern. LSD verursachte in Dosen über 0,02 mg/kg selbst eine starke Abnahme des Bronchialvolumens.

Die Methode von Konzett u. Rössler zur Messung des Bronchialvolumens verlangt künstliche Beatmung bei eröffnetem Thorax. Im Versuch der Abb. 1 war die Beatmung so eingestellt, daß noch spontane, von

der Belüftung der Lunge unabhängige Atembewegungen auftraten, eine unphysiologische Überventilation also vermieden wurde. Dafür mußte in Kauf genommen werden, daß die Lunge kollabierte, was wiederum nicht den normalen Verhältnissen entspricht. Es wurden daher Versuche bei geschlossenem Thorax durchgeführt und entweder die bei Vagusreiz auftretenden Veränderungen der spontanen Atemtätigkeit registriert, oder es wurde die Spontanatmung durch Überventilation ausgeschaltet und das Bronchialvolumen in üblicher Weise nach Konzett u. Rössler gemessen.

Abb. 2 zeigt einen Versuch, in dem diese beiden Anordnungen verwendet wurden. Wie in Abb. 1 hemmte *Hexamethonium* Magenkontraktionen und Blutdrucksenkung und verstärkte die Abnahme des Bronchialvolumens nach Vagusreiz (Abb. 2a und d). Bei offenem Thorax waren die verstärkten Atembewegungen, die bei einer Bronchokonstriktion infolge der verminderten Ventilation auftraten (s. Abb. 1), ohne Einfluß auf die Belüftung der Lunge. Bei geschlossenem Thorax jedoch dehnt eine Hyperpnoe die Lunge und wirkt damit der Bronchokonstriktion als auslösendem Agens entgegen. Veränderungen der Spontanatmung sind somit kein empfindliches Kriterium für den Eintritt einer Bronchokonstriktion. Trotzdem trat in Abb. 2b nach Vagusreiz eine deutliche Hyperpnoe auf, die auch nach Hexamethonium noch zu beobachten war (Abb. 2c). Aus dem verschiedenen Aussehen der Atemexkursionen in (b) und (c) kann man keine Schlüsse ziehen, da die Funktion des Atemzentrums durch den stark erniedrigten Blutdruck sicher beeinträchtigt

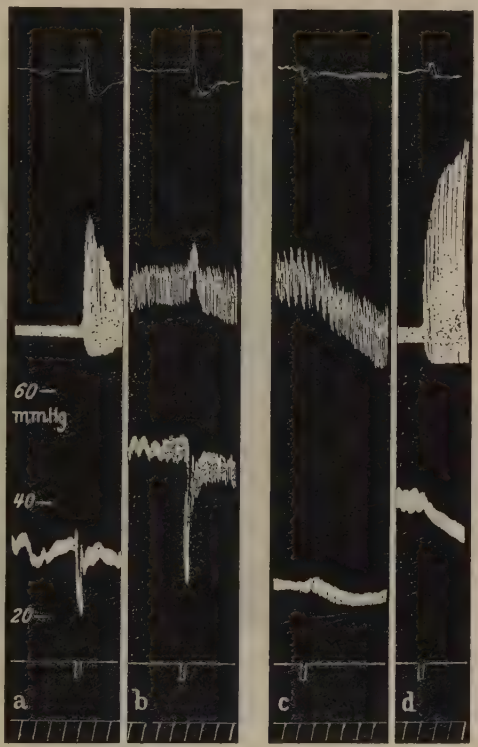


Abb. 2. *Unwirksamkeit von Hexamethonium gegen die Bronchokonstriktion bei Vagusreiz unter Überventilation und bei Spontanatmung.* — *Meerschweinchen*, 500 g, bivagotomiert, geschlossener Thorax. Beim Signal peripherer Stumpf des linken Vagus gereizt mit 10 Milliamp., 1 msec, 10 Imp/sec, 10 sec lang. Von oben nach unten: Magenkontraktionen (Ballon im Magen); Bronchialvolumen (*a* und *d*) bzw. spontane Atembewegungen. (*b* und *c*); Blutdruck; Reizmarkierung; Zeit in 30 sec Nach (*b*) 9 mg/kg Hexamethonium

war. Zum Vergleich beachte man die Veränderungen der Atembewegungen nach Hexamethonium in Abb. 1 bei eröffnetem Thorax.

Die Abnahme der Atembewegungen nach Gabe von Ganglienblockern bei eröffnetem Thorax ließ sich durch Zugabe von 5% CO_2 zur Atemluft verhindern. Trotz der auftretenden Hyperpnoe waren die Ganglienblocker unwirksam. Infolge der Adrenalinausschüttung durch die Hyperkapnie war die Stärke der Bronchokonstriktion mitunter geringer als bei den Kontrollen ohne CO_2.

Weder der Kollaps der Lunge noch der Überdruck bei künstlicher Beatmung können demnach die Resistenz der Bronchokonstriktion nach

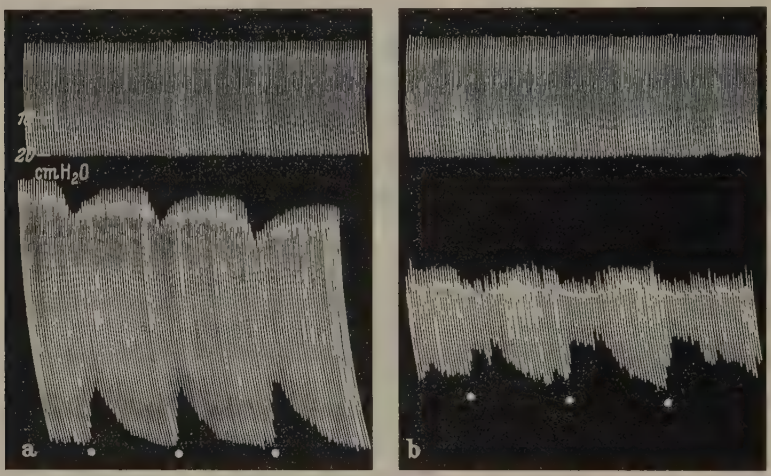


Abb. 3. *Wirkung von Hexamethonium auf die Bronchokonstriktion nach Vagusreiz an der isolierten Meerschweinchen-Lunge.* Oben: der zur Beatmung benötigte Unterdruck; unten: Atemexkursionen. Vagusreiz alle 90 sec mit 5 Milliamp., 0,5 msec, 20 Imp/sec, 15 sec lang. (*a*) Kontrolle, (*b*) 5 min nach Zugabe von Hexamethonium $4 \cdot 10^{-5}$ zur Perfusionsflüssigkeit

Vagusreiz gegen Ganglienblocker erklären. Auch entfällt der Einwand, die Ganglienblocker hätten durch den Überdruck in der Lunge die Ganglienzellen in den Bronchialwandungen nicht auf dem Blutweg erreichen können; im Versuch der Abb. 2 wurde Hexamethonium bei völlig normaler Spontanatmung gegeben.

Versuche an der *isolierten Lunge* brachten keine klaren Ergebnisse. Wie Abb. 3a zeigt, ließ sich mit der beschriebenen Modifikation der Methode von Delaunois u. King durch Vagusreiz eine reproduzierbare Bronchokonstriktion auslösen, die jedoch nicht immer voll reversibel war. *Hexamethonium* verursachte in einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ selbst eine Bronchokonstriktion, die auch in vivo beobachtet werden konnte. Trotzdem war die Wirkung des Vagusreizes noch vorhanden (Abb. 3b).

Ähnliche Versuche an *Katzen* führten zu anderen Ergebnissen als beim Merrschweinchen. Die Anordnung in Abb. 4, die einen solchen Versuch wiedergibt, ist dieselbe wie in Abb. 1, nur wurden die Atembewegungen nicht aufgezeichnet. Durch Injektion von Acetylcholin konnte bei der Katze keine Bronchokonstriktion ausgelöst werden. Dagegen führte ein peripherer *Vagusreiz* erwartungsgemäß zu Magenkontraktionen, Bronchokonstriktion und Blutdruckabfall. Nach 5 mg/kg Pendiomid traten die Magenkontraktionen zwar regelmäßig mit einer

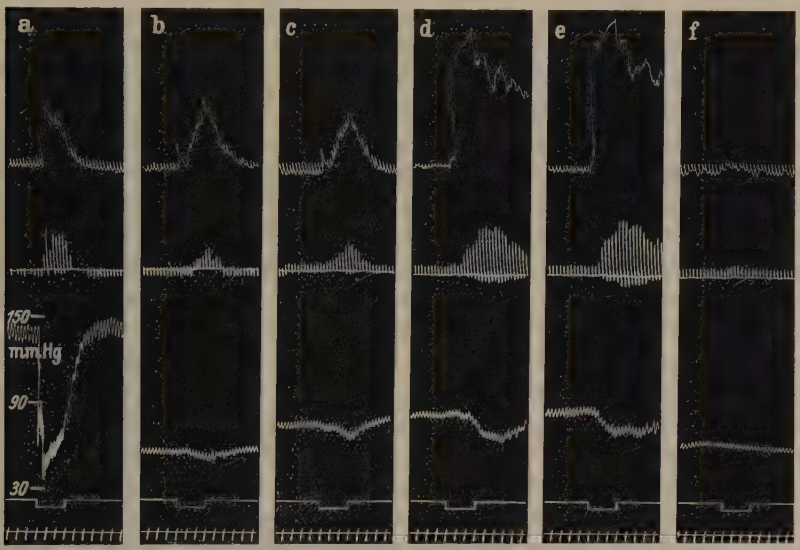


Abb. 4. *Resistenz der durch Vagusreiz ausgelösten Magenkontraktionen gegen Ganglienblocker.* — *Katze*, 2,5 kg, bivagotomiert, Thorax eröffnet. Beim Signal peripherer Stumpf des rechten Vagus gereizt mit 5 Milliamp., 1 msec, 20 Imp/sec, 30 sec lang. Von oben nach unten: Magenkontraktionen (Magen mit physiol. NaCl gefüllt); Bronchialvolumen; Blutdruck; Reizmarkierung; Zeit in 10 sec. Nach (*a*) 5 mg/kg Pendiomid; nach (*b*) 10 mg/kg Pendiomid; nach (*c*) 0,15 mg/kg Eserin; nach (*d*) 9 mg/kg Hexamethonium; nach (*e*) 0,04 mg/kg Atropin

gewissen Latenz auf, waren aber nicht schwächer als vorher (Abb. 4b). Eine ähnliche Beobachtung konnten Wien u. Mason bei Verwendung von Hexamethonium machen. Die Bronchokonstriktion war stark abgeschwächt, in der Regel aber nicht ganz aufgehoben. Auch die Blutdrucksenkung nach Vagusreiz konnte nicht immer völlig aufgehoben werden. In Abb. 4c trat z. B. trotz einer weiteren Gabe von 10 mg/kg Pendiomid nach einer Latenzzeit von 20 sec eine geringe Blutdrucksenkung ein. Bronchokonstriktion und Magenkontraktionen wurden auch durch diese größere Dosis Pendiomid (insgesamt 15 mg/kg) nicht weiter beeinflußt. Die Wirkung der ersten Dosis entsprach demnach bereits einer maximalen ganglionären Blockade. Solche gegen Ganglienblocker resistente Wirkungen eines peripheren Vagusreizes konnten durch

Cholinesterase-Hemmer verstärkt werden (Abb. 4d). Diese Potenzierung kann nicht auf einer Durchbrechung der ganglionären Blockade durch Stabilisierung des Acetylcholins beruhen, das von den präganglionären Nervenendigungen freigesetzt wird und nun in höheren Konzentrationen die Ganglienzellen erreicht; denn sie wurde durch eine zusätzliche Gabe von 9 mg/kg Hexamethonium nicht aufgehoben (Abb. 4e). Nach 0,04 mg/kg *Atropin* dagegen waren alle Wirkungen des Vagusreizes verschwunden. An ihrer *cholinergen* Natur kann demnach kaum ein Zweifel bestehen.

Nach den Ergebnissen von McSwiney u. Spurrel, Daly u. Evans sowie Agostoni, Chinnock, Daly u. Murray enthält das Ganglion nodosum bei der Katze nur Zellen *afferenter* Fasern, während Heinbecker u. O'Leary fanden, daß auch *efferente* Neuren zu Lunge und Duodenum im Ganglion nodosum entspringen.

Um zu sehen, ob der Erfolg eines efferenten Vagusreizes im Ganglion nodosum durch Ganglienblocker abgeschwächt wird, wurde der Vagus zwischen seinem Austritt aus dem Schädel und dem Ganglion nodosum gereizt. Bei der *Katze* wurde der Vagus oberhalb des Ganglion vom N. accesorius und N. hypoglossus freipräpariert und zentral durchtrennt. Beim *Meerschweinchen* wurde der Vagus in gleicher Weise präpariert, aber in seiner normalen Lage belassen, um die Elektroden leichter anbringen zu können. Bei seiner Austrittsstelle aus dem Schädel wurde der Nerv gequetscht, um ein Aufsteigen der Erregung zu verhindern. Die Elektroden waren in Plexiglas gebettet, und diese Halterung wurde in die eröffnete Bulla tympani geklemmt, über die der Vagus hinzieht. Stromschleifen konnten nicht vermieden werden, doch kann man bei der großen Entfernung zwischen Reizort und Erfolgsorgan annehmen, daß die Wirkung auf Herz, Lunge und Magen über den gereizten Vagus zustande kam, zumal der Vagus der Gegenseite durchtrennt war. Durch Injektion von Methylenblau in die Art. carotis konnte post mortem festgestellt werden, daß die Blutversorgung des Ganglions bei der Präparation nicht beeinträchtigt wurde.

Weder beim Meerschweinchen, noch bei der Katze wurde der Reizerfolg beim Passieren des Ganglion nodosum durch Ganglienblocker abgeschwächt. Es ist bekannt, daß im Halsvagus verstreut Ganglienzellen liegen (Dolgo-Saburoff sowie Botar, Afra, Moritz, Schiffmann u. Scholz), die evtl. als Umschaltstellen für parasympathische Fasern in Frage kommen. Deswegen sei betont, daß die Wirkung der Ganglienblocker auch bei Reizung einer weit zentralwärts gelegenen Stelle des Vagus nicht stärker war als bei Reizung nahe dem Eintritt des Vagus in den Thorax.

In 2 Versuchen an *Meerschweinchen* wurde das Rückenmark zwischen dem 1. und dem 2. Halswirbel durchtrennt und Elektroden knapp unter dem Os occipitale durch die Membrana atlantooccipitalis in die Medulla oblongata eingestochen. Elektrische Reizung der Medulla führte zu einer Bronchokonstriktion, die jedoch schlecht reproduzierbar war. Eine Verminderung des Reizerfolges durch

Hexamethonium konnte nicht beobachtet werden. Auch diese Versuche gaben also keinen Hinweis auf eine Umschaltung im Ganglion nodosum oder im Ganglion jugulare.

Bei *Ratten* gelang es nicht, durch Vagusreiz eine Bronchokonstriktion hervorzurufen. Magenkontraktionen und Blutdrucksenkung wurden durch Ganglienblocker vollständig aufgehoben.

Diskussion

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen kann man dahin zusammenfassen, daß beim *Meerschweinchen* die Bronchokonstriktion und bei der *Katze* die Erregung des Magens bei Reizung des Vagus durch Ganglienblocker nicht ausgeschaltet werden können.

Alles spricht dafür, daß Bronchokonstriktion bzw. Magenkontraktionen durch die autonomen, cholinergen Fasern im Vagus ausgelöst werden: Die Bronchokonstriktion wird durch Eserin verstärkt und durch Atropin aufgehoben (Hebb) und Thornton fand eine Freisetzung von Acetylcholin aus der Meerschweinchenlunge bei Vagusreiz. Dasselbe gilt für die Magenkontraktionen nach Vagusreiz, die ebenfalls mit einer Ausschüttung von Acetylcholin einhergehen (Dale u. Feldberg). Dies und die Unwirksamkeit von *Luvistin*, *Regitin* und *LSD* sprechen für einen *cholinergen* Mechanismus. Die Bronchokonstriktion wird durch marklose Fasern (C-Fasern) ausgelöst (Job u. Schaumann), deren efferenter Teil zum *autonomen* Nervensystem gehört (Heinbecker). Zum Magen ziehen fast ausschließlich marklose Fasern (Agostoni et al.), so daß nur diese für die Auslösung der Magenkontraktionen in Frage kommen.

Warum aber lassen sich die durch Vagusreiz verursachte Bronchokonstriktion beim Meerschweinchen und die Magenkontraktionen bei der Katze durch Ganglienblocker nicht verhindern, obwohl beide durch autonome, cholinerge Fasern ausgelöst werden, deren ganglionäre Synapsen im allgemeinen erst im Erfolgsorgan liegen? Die einfachste Erklärung wäre, daß im Vagus *postganglionäre* Neurone zur Lunge bzw. zum Magen ziehen. Die Annahme postganglionärer cholinerger Fasern in peripheren autonomen Nerven ist nicht neu. So sah Hebb am Meerschweinchen bei Reizung des Ganglion stellatum eine Bronchokonstriktion, die so wie die bei Vagusreiz durch Eserin verstärkt und durch Atropin aufgehoben, durch Nicotin aber nicht verhindert wurde. Ursillo u. Clark fanden an einem isolierten Nerv-Blasenpräparat des Kaninchens eine cholinerge Kontraktion bei Reizung der Nerven, die durch Ganglienblocker ebenfalls nicht gehemmt werden konnte. Die Autoren schlossen in beiden Fällen auf eine Erregung postganglionärer cholinerger Fasern.

Zwar gibt es in der Anatomie Beispiele für parasympathische Ganglien außerhalb der Erfolgsorgane: das Ganglion ciliare, sphenopalatinum und oticum. Im Ganglion nodosum und im Ganglion jugulare des Vagus

scheinen jedoch nach den meisten *histologischen* (Chase u. Ranson; Agostoni et al.) und nach den vorliegenden *pharmakologischen* Befunden keine motorischen Ganglienzellen zu liegen. Nach Untersuchungen von Dolgo-Saburoff; und Botar, Afra, Moritz, Schiffmann u. Scholz an Katzen sind im Stamm des Vagus Ganglienzellen eingestreut. Die geringe Bronchokonstriktion und Blutdrucksenkung, die nach Ganglienblockern bei der Katze noch vorhanden sein können, lassen sich daher evtl. durch eine Reizung postganglionärer Fasern erklären. Für die *Stärke* der Magenkontraktionen bei der Katze und für die Bronchokonstriktion beim Meerschweinchen nach Gabe von Ganglienblockern war es jedoch belanglos, ob der Vagus an einer weiter *zentral* oder *peripher* gelegenen Stelle gereizt wurde. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß es sich in diesen Fällen um eine Reizung postganglionärer Fasern handelte.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß die motorischen Vagusfasern in den beschriebenen Fällen in normaler Weise umgeschaltet werden, die Ganglienzellen aber besonders unempfindlich gegen Ganglienblocker sind. Es ist zwar bekannt, daß die Ganglienzellen in dem einen Organ durch geringere Dosen von Ganglienblockern ausgeschaltet werden können als in einem anderen; bei Erhöhung der Dosis tritt in diesem Falle schließlich doch eine allgemeine ganglionäre Blockade ein. Beim *Meerschweinchen*, bei dem sich die ganglionäre Übertragung in Herz und Magen bereits durch 1 mg/kg Pendiomid unterbrechen ließ, waren in der Lunge auch sehr so hohe Dosen von Pendiomid und Hexamethonium unwirksam. Bei der *Katze* spricht der verzögerte Eintritt der Magenkontraktionen nach geringen Mengen von Ganglienblockern für eine Beteiligung von Ganglienzellen bei der Übertragung des Vagusreizes. Die unverminderte Intensität der Kontraktionen auch nach großen Dosen zeigt dagegen um so deutlicher, daß daneben eine von Ganglienzellen unabhängige Erregungsleitung bestehen muß.

Man kann aus den besprochenen Ergebnissen nur schließen, daß die Erregung, die über die motorischen Vagusfasern beim Meerschweinchen die Lunge bzw. bei der Katze den Magen erreicht, weder in den Organen selbst, noch in weiter zentralwärts gelegenen Ganglienzellen von prä- auf postganglionäre Neurone umgeschaltet wird. Vielmehr scheinen die Impulse das Erfolgsorgan ohne pharmakologisch beeinflußbare ganglionäre Unterbrechung zu erreichen. Das könnte einmal dadurch zustande kommen, daß autonome motorische Fasern wie im somatischen Nervensystem ohne Unterbrechung vom Rückenmark zur Muskulatur ziehen. Oder es werden präganglionäre Fasern erregt, die neben ihrer Verbindung mit Ganglienzellen Kollaterale direkt zur Muskulatur senden. Das würde erklären, warum Ganglienblocker den Eintritt der Magenkontraktionen bei der Katze zwar verzögern, aber nicht abschwächen können.

Summary

In experiments on guinea-pigs and cats, records were taken of the changes in blood pressure, bronchial volume, and gastric motility, provoked by peripheral vagal stimulation or by injected acetylcholine.

In the *guinea-pig*, fall in blood pressure and contractions of the stomach on stimulation of the vagi were suppressed by small amounts of ganglionic blocking drugs, whereas even large doses did not affect the *bronchoconstriction* on vagal stimulation.

In the *cat*, fall in blood pressure and bronchoconstriction on vagal stimulation were practically abolished by ganglionic blocking agents. The contractions of the *stomach*, however, were only delayed in their onset, whereas their intensity was not reduced by high doses of hexamethonium and pendiomid.

Cholinesterase inhibitors enhanced, and atropine abolished those effects of vagal stimulation which were insensitive to ganglion blocking drugs. It is concluded that these effects are mediated by cholinergic fibres.

No evidence was obtained that these fibres might synapse in ganglion cells situated in the vagus trunc or in the nodose or jugular ganglion.

The results suggest that at least part of the bronchoconstrictor fibres to the lung of the *guinea-pig*, and of the motor fibres to the stomach of the *cat*, reach the effector organs without being interrupted by ganglion cells.

Literatur

Agostoni, E., J. E. Chinnock, M. de Burgh Daly and J. G. Murray: J. of Physiol. **135**, 182 (1957). — Alberty, J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **95**, 408 (1953). — Botar, J., D. Afra, P. Moritz, H. Schiffmann and M. Scholz: Acta anatomica **10**, 284 (1950). — Chase, M. R., and S. W. Ranson: J. comp. Neur. **24**, 31 (1914). — Dale, H. H., and W. Feldberg: J. of Physiol. **81**, 320 (1934). — Daly, M. de Burgh, and D. H. L. Evans: J. of Physiol. **120**, 579 (1953). — Delaunois, A. L., and T. O. King: Arch. internat. Pharmacodynamie **107**, 90 (1956). — Dolgo-Saburoff, B.: Z. Anat. **105**, 79 (1936); **106**, 637 (1937). — Greeff, K., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 427 (1956). — Hebb, C. O.: J. of Physiol. **99**, 57 (1940). — Heinbecker, P.: Amer. J. Physiol. **93**, 284 (1930). — Heinbecker, P., and J. O'Leary: Amer. J. Physiol. **106**, 623 (1933). — Job, C., u. W. Schaumann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 388 (1957). — Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — McSwiney, B. A., and W. R. Spurrell: J. of Physiol. **77**, 447 (1933). — Perry, W. L. M., and J. Talesnik: J. of Physiol. **119**, 455 (1953). — Thornton, J. W.: J. of Physiol. **82**, 14 P (1934). — Ursillo, R. C., and B. B. Clark: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **118**, 338 (1956). — Whitteridge, D.: J. of Physiol. **89**, 99 (1937). — Wien, R., and D. F. J. Mason: Brit. J. Pharmacol. **6**, 611 (1951).

Dr. W. Schaumann, Pharmakolog. Institut der Universität Frankfurt am Main, Ludwig-Rehn-Straße 14, Theodor-Stern-Haus

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 388—390 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Innsbruck
(Vorstand: Prof. Dr. A. Jarisch)

Bronchokonstriktorische Fasern im Halsvagus des Meerschweinchens*

Von
C. Job und W. Schaumann

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Juni 1957)

In einer vorangegangenen Arbeit wurde die Beobachtung gemacht, daß beim Meerschweinchen eine Bronchokonstriktion nach Vagusreiz durch Ganglienblocker nicht aufgehoben werden kann (Schaumann). Da der Vagus Fasern verschiedener Leitungsgeschwindigkeit und Funktion enthält, sollte untersucht werden, welche Art von Fasern die beschriebene Bronchokonstriktion auslöst.

Methode

Bei Meerschweinchen in Urethan-Narkose wurde das Bronchialvolumen nach der Methode von Konzett u. Rössler registriert. Beide Vagi wurden durchschnitten. Der linke Vagus wurde möglichst nahe seinem Eintritt in den Thorax zur Reizung, und möglichst nahe seinem Austritt aus dem Schädel zur Abnahme der Aktionspotentiale freipräpariert. Zwischen Reiz- und Ableitelektroden blieb ein etwa 1 cm langes Stück in Verbindung mit dem umgebenden Gewebe zur Aufnahme der Erdleitung. Der Abstand zwischen Reiz- und Ableitelektroden betrug etwa 3 cm. Ein warmes Paraffinbad schützte den Nerv vor dem Austrocknen. — Zur Abnahme der Aktionspotentiale wurde mit einzelnen Thyratron-Entladungen gereizt, wobei die zentralwärts gelegene Elektrode als Kathode diente. Um die Wirkung derselben Reizstärke auf das Bronchialvolumen zu bestimmen, wurde umgepolt und mit einer Frequenz von 10 Imp/sec während 10 sec gereizt. Die Impulsstärke wurde mit einem zweiten Kathodenstrahloszillographen aufgezeichnet.

Ergebnisse

Dicke Fasern mit hoher Leitungsgeschwindigkeit haben eine niedrigere Reizschwelle als dünne, langsam leitende. Man kann daher mit Impulsen wachsender Intensität erst nur die dicken und nach und nach auch die dünneren Fasern erregen. Durch gleichzeitige Registrierung des Bronchialvolumens und oszillographische Aufzeichnung der Aktionspotentiale war es möglich, die Größe bzw. Leitungsgeschwindigkeit der Fasern festzustellen, deren Reizung zu einer Bronchokonstriktion führt.

In Abb. 1 wurden Aktionspotentiale bei niedriger Reizintensität über eine Distanz von 3 cm in zwei deutliche Maxima aufgespalten. Die

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Aktionspotentiale wurden in diesem Versuch zugleich von zwei Elektroden abgeleitet, die 6,7 mm voneinander entfernt waren. Bei genauer Messung ergibt sich aus dem Vergleich mit der Zeitmarkierung, daß die erste, große Welle 0,3 msec zum Durchlaufen dieser Strecke brauchte, und die zweite, kleinere 0,6 msec. Daraus lassen sich die Leitungsgeschwindigkeiten der entsprechenden Gruppen von Nervenfasern mit 22 bzw. 11 m/sec errechnen. Es handelt sich demnach um B_1- und B_2-Fasern nach der Einteilung von Bishop u. Heinbecker.

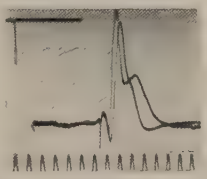


Abb. 1. Aktionspotential des N. Vagus, von 2 Elektroden im Abstand von 6,7 mm abgeleitet. Zeitmarkierung in 1000 Hz

In Abb. 2 sind B_1- und B_2-Komplex des Aktionspotentials noch besser voneinander getrennt. Bei langsamer Zeitablenkung sieht man, daß durch die niedrige Reizintensität in Abb. 2a keine Fasern mit geringerer Leitungsgeschwindigkeit erregt wurden, und bei tetanischer Reizung mit derselben Intensität trat keine Bronchokonstriktion auf. Durch Erhöhung der Reizstärke (Abb. 2b) wurde der B-Komplex des Aktionspotentials in Größe

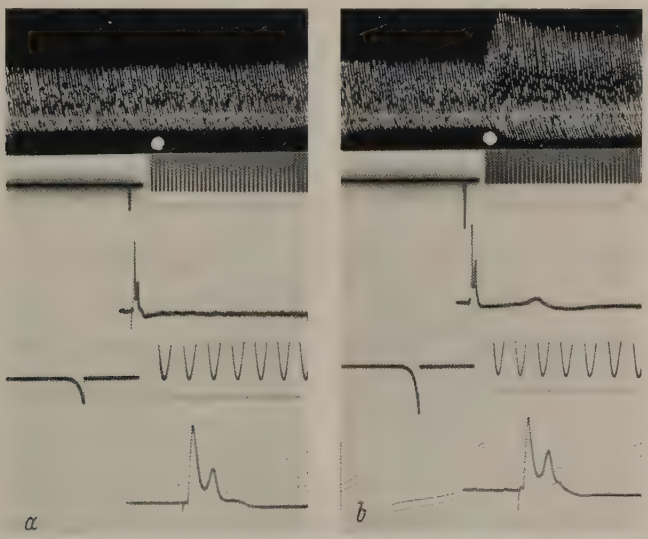


Abb. 2. Bronchialvolumen und Aktionspotentiale vom N. Vagus bei Reizung mit (*a*) geringer und (*b*) hoher Intensität. Aktionspotentiale bei langsamer (Mitte) und schneller (unten) Zeitablenkung. Zeitmarkierung in 1000 Hz; links neben der Zeitschreibung ist die Impulsstärke registriert

und Form nicht mehr verändert. Dagegen wurden nun auch Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von etwa 1 m/sec erregt, deren Aktionspotential bei langsamer Zeitablenkung sichtbar wird. Tetanische Reizung mit dieser hohen Intensität verursachte eine Bronchokonstriktion, die

demnach nur durch die langsam leitenden, sogenannten C-Fasern ausgelöst wurde. In einem anderen Versuch an einem besonders empfindlichen Tier konnte auch ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Stärke der Bronchokonstriktion und der Höhe des C-Potentials festgestellt werden.

Diskussion

Durch elektrophysiologische und histologische Untersuchungen am N. Vagus der Katze kamen Heinbecker u. O'Leary zu dem Schluß, daß die efferenten Fasern zu Herz, Lunge und Magen-Darmtrakt den B_2- und C-Komplexen der fortgeleiteten Aktionspotentiale entsprechen. Die vorliegenden Befunde stimmen damit überein und zeigen, daß die Bronchokonstriktion nach elektrischer Reizung des Vagus durch C-Fasern ausgelöst wird.

Summary

In guinea-pigs, the peripheral end of the vagus was stimulated with electrical impulses of different intensities. The action potentials set up by single shocks were compared with the changes in bronchial caliber produced by tetanic stimulation using the same stimulus strength.

Is was concluded that the bronchoconstriction on vagal stimulation is mediated by non-medullated fibres.

Literatur

Bishop, G. H., and P. Heinbecker: Amer. J. Physiol. **94**, 170 (1930). — Heinbecker, P., and J. O'Leary: Amer. J. Physiol. **106**, 623 (1933). — Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — Schaumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 378 (1957).

Dr. W. Schaumann, Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Ludwig-Rehn-Straße 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 391—400 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Mineralstoffwechselwirkung und Toxicität des Strophanthins bei nebennierenlosen Ratten

Von
K. Greeff

(Eingegangen am 26. Juni 1957)

Frühere Untersuchungen (Greeff u. Westermann) hatten ergeben, daß die bei Ratten nach hohen Strophanthindosen auftretenden Lähmungserscheinungen mit einer Kaliumverarmung des Skeletmuskels und einer Kaliämie einhergehen, während die Natriumwerte im Serum und Muskel sich spiegelbildlich verhielten. Es kommt demnach unter der Strophanthinwirkung in der Muskelzelle zu einem Austausch von Kaliumionen gegen Natriumionen. Im Harn ließ sich schon nach 24 γ/100 g s. c. eine 100%ige Erhöhung der renalen Kaliumausscheidung nachweisen. Die Natriumausscheidung war nach diesen kleinen Dosen vermindert (Bode u. Greeff; Greeff). Die Wirksamkeit des Strophanthins auf die Kaliumausscheidung bei Ratten liegt in der gleichen Größenordnung wie diejenige der Nebennierenrindenhormone. In Versuchen von Dessaulles, Tripod u. Schuler an Ratten führten 30 γ/Tier Doca bzw. 6 γ Aldosteron zu einer um 50% vermehrten Elimination von Kalium.

Die Wirkung des Strophanthins auf den Elektrolythaushalt legt deshalb den Gedanken an eine Mitwirkung der Nebennierenrindenhormone als wichtiger körpereigener Regulatoren des Mineralstoffwechsels nahe. Hierfür könnte ferner sprechen, daß bei Ratten und Meerschweinchen längerdauernde Behandlung mit Strophanthin eine Nebennierenhypertrophie verursacht (v. Metzler, Moskopf, Gardner), die auch bei hypophysektomierten Tieren auftritt (v. Metzler u. Greeff) und sich dadurch von der bei allgemeinen Stress-Reaktionen über eine ACTH-Ausschüttung zustande kommende Nebennieren-Hypertrophie unterscheidet. Andererseits darf als gesichert gelten, daß Strophanthin *selbst* charakteristische Veränderungen des Ionenhaushaltes hervorruft: so kommt es zu einem erhöhten Kaliumverlust auch des *isolierten* Zwerchfellmuskels bei der Inkubation mit Strophanthin (Greeff u. Westermann) und bei „Kälte-Erythrocyten" mit vermindertem Kalium- und erhöhtem Natriumgehalt zu einer Hemmung der bei Körpertemperatur und Glucosegegenwart erfolgenden Wiederaufnahme von Kalium und Abgabe von Natrium (Schatzmann). In Versuchen an isolierten

Froschmuskeln fanden Matchett u. Johnson sowie Schatzmann u. Witt, daß Strophanthin in der Erholungsphase den Rücktransport von Kalium und den Austritt von Natrium hemmt.

In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob Strophanthin auch an nebennierenlosen Ratten die früher an Normaltieren beobachteten Wirkungen auf den Mineralstoffwechsel, insbesondere auf die Elektrolytausscheidung im Harn ausübt.

Versuche

1. Die Wirkung des Strophanthins auf den Kalium- und Natriumgehalt des Serums und Muskels

Für die Versuche benutzten wir männliche weiße Ratten von 110—130 g. Die Epinephrektomie erfolgte nach der von Burn beschriebenen Standardmethode. Zur Bestimmung des Kalium-Natriumgehaltes des Serums und Muskels wurden die Tiere durch Dekapitation getötet; das abfließende Blut wurde nach der Gerinnung zentrifugiert und im abgeheberten Serum Kalium und Natrium flammenphotometrisch bestimmt. Zur Bestimmung des Elektrolytgehaltes des Skeletmuskels (M. tibialis anterior) wurden nach Ermittelung des Feucht- und Trockengewichtes ein aliquoter Teil des Trockenpulvers unter dauerndem Schütteln mit aqua dest. 4 Std lang extrahiert und die Elektrolyte im filtrierten Extrakt ebenfalls flammenphotometrisch bestimmt.

Die Tab. 1 enthält das Ergebnis eines an 29 nebennierenlosen Ratten durchgeführten Versuches. Am 5. Tage nach der Epinephrektomie erhielten je 12 Tiere 30 bzw. 100 γ k-Strophanthin in 0,1 cm³ aqua dest. subcutan, die restlichen 5 Tiere dienten als Kontrollen und erhielten 0,1 cm³ aqua dest. subcutan. 30 min nach der Injektion wurden je 6 der mit Strophanthin behandelten Ratten zusammen mit den 5 Kontrolltieren getötet. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, war bei den mit 100 γ Strophanthin behandelten Ratten der Kaliumgehalt des *Serums* nach 30 min stark erhöht. Er betrug 10,8 mMol/l (42,5 mg-%) gegenüber 7,04 mMol/l (27,5 mg-%) bei den Kontrolltieren. Die Natriumwerte des Serums erfuhren keine signifikante Änderung. Im *Skeletmuskel* war demgegenüber der Kaliumgehalt signifikant erniedrigt und der Natriumgehalt erhöht. Auch die *kleinere* Dosis von 30 γ k-Strophanthin führte zu einem signifikanten Anstieg des Natriumgehaltes im Muskel. Sie reichte nicht aus, um das Muskel-Kalium signifikant zu erniedrigen.

Wie an Normaltieren führt Strophanthin demnach auch an nebennierenlosen Tieren zu einer akuten Kaliämie und im Skeletmuskel zu einer Abnahme des Kaliumgehaltes und einer Zunahme des Natriumgehaltes. Es darf deshalb angenommen werden, daß diese Strophanthinwirkungen Eigenwirkungen sind und ohne Beteiligung von Hormonen der Nebennierenrinde zustande kommen.

Die in früheren Versuchen an Normaltieren erst nach 150—300 γ/100 g Strophanthin auftretenden Lähmungserscheinungen beobachteten

Tabelle 1. *Einfluß von k-Strophanthin auf den Kalium- und Natriumgehalt des Serums und des M. tibialis bei epinephrektomierten Ratten* (siehe Text)

n	k-Strophanthin γ/100 g subcutan	Best. nach min	Serum		M. tibialis		
			Kalium mMol/l	Natrium mMol/l	Wassergehalt %	Kalium mMol/kg	Natrium mMol/kg
5	0	30	7,04 (± 0,20)	201 (± 7,2)	75,1	102,0 (± 0,84)	27,1 (± 0,39)
6	30	30	7,30 (± 0,31)	213 (± 8,8)	75,2	99,0 (± 2,34)	31,0 (± 0,74)[1]
6	100	30	10,80 (± 0,23)[1]	190 (± 6,5)	75,9	94,5 (± 0,84)[1]	38,4 (± 2,05)[1]
6	30	180	7,44 (± 0,23)	201 (± 7,2)	75,1	96,0 (± 0,92)[1]	28,9 (± 1,10)
3	100	180	6,15 (± 0,38)	213 (± 4,5)	74,9	92,0 (± 1,48)	35,4 (± 0,83)[1]

n Anzahl der Tiere. In Klammern der mittlere Fehler des Mittelwertes. [1] signifikant gegenüber Kontrolltieren mit 19/20 Wahrscheinlichkeit.

Tabelle 2. *Vergleich der Wirkung von 25 γ-k-Strophanthin auf die renale Ausscheidung normaler (scheinoperierter) und epinephrektomierter Ratten* (siehe Text). Epinephrektomie 6 Tage vorher. Mittelwerte von 4 Gruppen zu je 4 Tieren, in Klammern der mittlere Fehler des Mittelwertes. Versuchszeit 4 Std mit zweimaliger peroraler Verabfolgung von je 2 cm³/100 g aqua dest.

	subcutan pro 100 g	Harnvolumen cm³/kg	Kalium mMol/kg	Natrium mMol/kg	Chlor mMol/kg
scheinoperiert	0,1 cm³ aqua dest.	39,9 (± 1,8)	0,820 (± 0,13)	0,60 (± 0,082)	0,69 (± 0,085)
	25 γ k-Strophanthin	48,7 (± 2,2)	2,27 (± 0,19)	0,38 (± 0,030)	1,25 (± 0,059)
epinephrektomiert	0,1 cm³ aqua dest.	30,2 (± 2,1)	0,955 (± 0,061)	0,55 (± 0,026)	0,56 (± 0,068)
	25 γ k-Strophanthin	30,1 (± 2,2)	2,06 (± 0,085)	0,79 (±0,048)	1,43 (± 0,048)

wir bei epinephrektomierten Tieren schon nach der Injektion von 50 bis 100 γ/100 g. Sie begannen 20—30 min nach der Injektion und klangen nach 60—80 min ab. 3 der 6 Tiere, die 180 min nach der Strophanthininjektion getötet werden sollten, starben schon nach 45—60 min. Die restlichen 3 Tiere wurden nach 180 min getötet. Obwohl auch bei ihnen ausgeprägte Lähmungserscheinungen aufgetreten waren, ließ sich — in Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden an Normaltieren — 3 Std nach der Strophanthininjektion keine Kaliämie mehr nachweisen, während im Muskel die Kaliumwerte noch deutlich erniedrigt und die Natriumwerte erhöht waren. Auch bei den mit der kleineren Strophanthindosis von 30 γ/100 g behandelten Tieren fand sich noch 3 Std nach der Injektion eine signifikante Abnahme des Kaliumgehaltes im Skelettmuskel.

2. Der Einfluß von Strophanthin auf die renale Elektrolytausscheidung

Die epinephrektomierten Tiere wurden ebenso wie die scheinoperierten Kontrolltiere vom Operationstage an bei konstanter Raumtemperatur (28° C) gehalten und erhielten eine Standardkost aus Kartoffeln und Hafer mit einem Zusatz von 5,8 g/kg NaCl (Kaliumgehalt etwa 500 mg, Natriumgehalt etwa 250 mg pro 100 g Futter). 12 Std vor dem Versuch wurde das Futter, nicht das Trinkwasser entzogen. Die Kalium- und Natriumbestimmungen erfolgten flammenphotometrisch, die Chlorbestimmungen titrimetrisch nach Kuschinsky u. Langecker.

Für die Diureseversuche wurden Gruppen von je 4 Ratten (150—190 g) in Diuresekäfige zusammengesetzt. Die Tiere erhielten alle 2 Std 2 cm³/100 g aqua dest. peroral. Nach einer 2stündigen Vorperiode wurde 0,1 cm³ einer wäßrigen Strophanthinlösung subcutan injiziert; die Kontrolltiere erhielten 0,1 cm³ aqua dest.

In der Tab. 2 ist ein Versuch an 32 scheinoperierten und 32 epinephrektomierten Ratten dargestellt. 4 Kontrollgruppen zu je 4 scheinoperierten Tieren erhielten 0,1 cm³/100 g aqua dest., 4 weitere Gruppen 25 γ/100 g k-Strophanthin in 0,1 cm³ aqua dest. subcutan. Entsprechend erhielten je 4 Gruppen epinephrektomierter Tiere aqua dest. bzw. Strophanthin.

Vergleicht man zunächst die Harnmengen der epinephrektomierten und der scheinoperierten Normaltiere miteinander, so ergibt sich, daß die Normaltiere die zugeführte Wassermenge (40 cm³/kg Körpergewicht in 4 Std) vollständig ausschieden, während die epinephrektomierten Tiere etwa 25% retinierten. Das entspricht der bekannten Diuresehemmung bei Nebenniereninsuffizienz. Die Kalium- und Natriumausscheidung ist bei den epinephrektomierten und scheinoperierten Tieren nicht signifikant verschieden, was mit der natriumreichen Ernährung der Tiere zu erklären sein dürfte.

Das wesentlichste Ergebnis des Versuches ist, daß Strophanthin in gleicher Weise am epinephrektomierten und am normalen Tier die *Kalium- und Chlor*ausscheidung fördert, daß jedoch seine Wirkung auf die *Wasser-* und *Natrium*ausscheidung bei normalen und epinephrektomierten

Tieren verschieden ist. Während bei Normaltieren die *Natrium*ausscheidung wie in unseren früheren Untersuchungen durch 25 γ k-Strophanthin vermindert wird (— 34%), ist sie bei den nebennierenlosen Tieren erhöht (+ 31%). Die *Wasser*ausscheidung, die bei Normaltieren signifikant zunimmt, bleibt bei den nebennierenlosen Tieren unbeeinflußt.

Tabelle 3. *Die Wirkung verschiedener k-Strophanthindosen auf die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung*

Mittelwerte zweier Gruppen von je 4 Ratten. Versuchszeit 4 Std mit zweimaliger Verabfolgung von je 2 cm³/100 g aqua dest. Epinephrektomie 6 Tage vor dem Versuch

	subcutan pro 100 g	Harnvolumen cm³/kg	Kalium mMol/kg	Natrium mMol/kg
scheinoperiert	0,1 cm³ aqua dest.	42,9	0,59	0,67
	12,5 γ k-Strophanthin	44,6	1,24	0,49
	25 γ k-Strophanthin	51,2	2,55	0,37
	50 γ k-Strophanthin	49,5	4,13	0,84
epinephrektomiert	0,1 cm³ aqua dest.	27,7	0,84	0,43
	12,5 γ k-Strophanthin	26,4	1,12	0,40
	25 γ k-Strophanthin	27,8	2,26	0,89
	50 γ k-Strophanthin	18,8	1,79	0,87

Die bei normalen und epinephrektomierten Tieren verschiedene Wirkung des Strophanthins auf die Wasser- und Natriumausscheidung findet sich auch in anderen Dosierungsbereichen (Tab. 3). In diesem Versuch erhielten je 2 Gruppen von 4 Ratten 12,5 γ, 25 γ und 50 γ/100 g k-Strophanthin, 2 Kontrollgruppen 0,1 cm³/100 g aqua dest. Eine Hemmung der *Natriumausscheidung*, wie sie nach kleinen Strophanthindosen (12,5 und 25 γ) beim Normaltier auftritt, läßt sich an nebennierenlosen Tieren wiederum nicht nachweisen; im Gegenteil bewirkt Strophanthin bei ihnen in jeder Dosierung eine Zunahme der Natriumausscheidung. — Die *Wasserausscheidung*, die bei Normaltieren in deutlicher Abhängigkeit von der Dosierung gesteigert wird, bleibt nach 12,5 und 25 γ k-Strophanthin unbeeinflußt und wird durch 50 γ — eine Dosis, die bereits Lähmungswirkungen ausübt — gehemmt. Demgegenüber steht die übereinstimmende Wirkung auf die *Kaliumausscheidung:* sowohl bei den scheinoperierten Normaltieren als bei den epinephrektomierten Tieren führt Strophanthin in jeder Dosierung zu einer Mehrausscheidung. Bemerkenswert ist, daß die epinephrektomierten Tiere nicht empfindlicher reagieren, obwohl bei ihnen die Toxicität des Strophanthins wesentlich erhöht ist (siehe den folgenden Abschnitt).

Aus diesen Versuchen darf somit gefolgert werden, daß der durch Strophanthin verursachten Kaliurie eine Eigenwirkung zugrunde liegt, die ohne Beteiligung von Hormonen der Nebennierenrinde zustande kommt. Demgegenüber scheint die wasserdiuretische Wirkung des Strophanthins sowie die durch kleine Dosen zustandekommende Natriumretention die Mitwirkung von Nebennierenrindenhormonen zu erfordern bzw. einen durch diese gewährleisteten normalen Mineralhaushalt und eine normale Nierenfunktion zur Voraussetzung zu haben.

3. Die Toxicität des Strophanthins bei nebennierenlosen Ratten

Die Bestimmung der lähmenden und tödlichen Dosis (DL_{50}) bei subcutaner Injektion erfolgte an Gruppen von je 4—5 Tieren (170—230 g), die wie in den Diureseversuchen eine kochsalzreiche Standardkost erhielten und bei einer Raumtemperatur von 28° C gehalten wurden. Die zum Herzstillstand führende Dosis wurde elektrokardiographisch an narkotisierten Normaltieren (1,4 g/kg Urethan s. c.) durch i. v. Infusion einer $1^0/_{00}$igen k-Strophanthinlösung in 0,9% NaCl ermittelt; bei epinephrektomierten Tieren mußte die Strophanthin-Konzentration auf $0{,}1^0/_{00}$ reduziert werden, um vergleichbare Infusionszeiten einhalten zu können. In allen Fällen betrug die Infusionsgeschwindigkeit 0,07 cm^3/min.

a) Die Minimaldosis, die bei sämtlichen Tieren *Lähmungserscheinungen* verursachte, betrug für normale Ratten 150 γ/100 g subcutan, für epinephrektomierte 50 γ/100 g (Tab. 4). Ein Teil der epinephrektomierten Tiere wurde jedoch auch erst durch 100—150 γ/100 g k-Strophanthin gelähmt. In diesen Fällen — 6 von insgesamt 27 (22%) — war es trotz Epinephrektomie offenbar wegen versprengter Nebennierenkeime nicht zu einer stärkeren Nebenniereninsuffizienz gekommen; denn die Tiere überlebten nach Umstellung auf natriumarme Normalkost, während alle übrigen im Verlauf von 14 Tagen starben. Die hohe Empfindlichkeit gegenüber der lähmenden Wirkung des Strophanthins haben wir bei den folgenden Toxicitätsbestimmungen und vorangegangenen Diureseversuchen als Kriterium für eine durch die Epinephrektomie tatsächlich erzielte Nebenniereninsuffizienz benutzt: alle epinephrektomierten Tiere erhielten am 3. oder 4. Tage nach der Operation 50 γ/100 g k-Strophanthin subcutan als Testdosis; nur diejenigen, bei denen deutliche Lähmungserscheinungen auftraten, wurden für die Versuche verwendet.

b) Toxicitätsbestimmungen wurden zwischen dem 6. und 9. Tag nach der Epinephrektomie bzw. der Scheinoperation durchgeführt. Da die Tiere natriumreich ernährt und im Thermoraum bei 28° C gehalten wurden, befanden sie sich in gutem Allgemeinzustand. Die Tab. 4 zeigt, daß die DL_{50} bei subcutaner Injektion von Strophanthin für epinephrektomierte Tiere etwa 15 mal niedriger ist als für Normaltiere. Der durch i. v. Infusion verursachte Herzstillstand trat bei 10fach niedrigerer Dosierung ein.

Tabelle 4. *Toxicität des k-Strophanthins bei normalen und epinephrektomierten Ratten* (siehe Text)

	Normaltiere		epinephrektomierte Tiere		Quotient
	n	mg/kg	n	mg/kg	
Lähmungsdosis 100% subcutan	23	1,5	21	0,5	3
DL 50 subcutan	21	15,1 (13,2—17,1)	22	0,94 (0,63—1,40)	15,9
DL i. v. Titration	6	11,7 (9,68—13,7)	4	1,09 (0,51—1,67)	10,7

n = Anzahl der Tiere. Quotient: Normaltiere/Epinephrektomierte Tiere. Die Werte in Klammern geben die Streuung mit 19/20 Wahrscheinlichkeit an, berechnet nach Lichfield u. Wilcoxon.

Tabelle 5. *Normalisierung der Strophanthinempfindlichkeit epinephrektomierter Ratten durch tägliche Behandlung mit Cortison bzw. Doca (Percorten)*
Beginn der Behandlung 12 Tage nach der Epinephrektomie

	DL i. v. Titration mg/kg		
unbehandelt	0,96;	0,31;	0,61
Cortison 2,5 mg/100 g tägl. 3 bzw. 4 Tage lang .	2,36;	2,27	
Percorten 2,5 mg/100 g tägl. 3 bzw. 4 Tage lang	2,17;	2,20	
Cortison 2,5 mg/100 g tägl. 7 bzw. 8 Tage lang	7,8;	11,0	
Percorten 2,5 mg/100 g tägl. 7 bzw. 8 Tage lang	8,4;	17,3	

Die Überempfindlichkeit der epinephrektomierten Tiere gegenüber Strophanthin ließ sich, wie orientierende Versuche ergaben, durch mehrtägige Behandlung mit Cortison bzw. Doca weitgehend beseitigen. In dem Versuch der Tab. 5 erhielten Ratten vom 12. Tage nach der Epinephrektomie an täglich 2,5 mg/100 g Cortison bzw. Doca (Percorten). Während bei den unbehandelten Kontrolltieren die Strophanthinempfindlichkeit 15—20 Tage nach der Epinephrektomie weiter zugenommen hatte (vgl. Tab. 4 und Tab. 5), bewirkte die Zufuhr von Cortison oder Doca in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer eine Abnahme bzw. Normalisierung der Strophanthinempfindlichkeit.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß Strophanthin ähnlich wie an Normaltieren so auch an nebennierenlosen Ratten ausgeprägte Wirkungen auf den Mineralstoffwechsel ausübt. Diese sind somit nicht durch eine Freisetzung von Rindenhormonen verursacht. Andererseits zeigen sich an nebennierenlosen Tieren, deutlicher als bisher an Normaltieren, Unterschiede gegenüber der Mineralstoffwechselwirkung der *Nebennierenrindenhormone*. Von den stark mineralstoffwechselwirksamen Steroidhormonen

Aldosteron und Doca ist bekannt, daß sie überwiegend den Natriumhaushalt beeinflussen (siehe z. B. neuere Übersicht von Gross).

Dessaulles, Tripod u. Schuler fanden z. B. an Ratten, daß Aldosteron die renale Natriumausscheidung schon in Dosierungen hemmt, die die Kaliumausscheidung noch unbeeinflußt lassen: nach 0,16 γ trat bereits eine 50%ige Hemmung der Natriumausscheidung ein, während zur Erzielung einer 50%igen Mehrausscheidung an Kalium 6 γ, d. h. eine 37fach höhere Aldosterondosis notwendig war. Beim Doca betrug das Verhältnis 1 : 7. Veränderungen des Kaliumhaushaltes nach Doca werden vielfach nicht als Primärwirkung, sondern als Folge der renalen Natriumretention aufgefaßt (Howell u. Davis; Seldin, Welt u. Cort). Für die überwiegende Bedeutung der Nebennierenrindenhormone für den Natriumhaushalt spricht ferner die seit langem bekannte Tatsache, daß bei nebennierenlosen Tieren allein die Zufuhr von Natriumchlorid genügt, um Insuffizienzerscheinungen zu verhindern, den erhöhten Kaliumgehalt im Blutplasma zu senken und die Überlebenszeit zu verlängern.

Die natriumretinierende Wirkung des Strophanthins ist demgegenüber schon bei normalen Ratten weit geringer als seine fördernde Wirkung auf die Kaliumelimination, und bei nebennierenlosen Ratten ließ sich eine Natriumretention überhaupt nicht nachweisen, während die Kaliumausscheidung auch hier in Abhängigkeit von der Dosierung bis über 200% gesteigert wurde.

Die verschiedenartige Wirkung auf Natrium- und Kaliumhaushalt spricht für einen verschiedenen *Angriffspunkt* des Strophanthins und der Nebennierensteroide. Die kaliuretische Wirkung des *Strophanthins* geht zeitlich mit einer Kaliämie und einer Kaliumverarmung des Skeletmuskels einher. Das spricht dafür, daß die Kaliurie — wenigstens überwiegend — extrarenal bedingt ist durch einen primären Austritt von Kaliumionen aus den Gewebszellen in das Interstitium und in das Blutplasma (im Austausch gegen Natriumionen). Folge des Kaliumanstiegs im Plasma ist dann die Kaliurie. Die *Nebennierensteroide* bewirken demgegenüber auch in hoher Dosierung niemals einen Anstieg, sondern nur einen Abfall des Kaliumgehaltes im Plasma, und die dabei auftretende Kaliurie ist wahrscheinlich renal bedingt. Pitts nimmt an, daß die Rindensteroide den Kalium-Natriumaustausch in den distalen Nierentubuli fördern, wobei Kalium vermehrt ausgeschieden und Natrium vermehrt rückresorbiert wird. *Übereinstimmend* wäre demnach, daß beide, Strophanthin und Rindenhormone, den cellulären Kalium-Natriumaustausch beeinflussen bzw. fördern, wobei Kalium gegen Natrium abgegeben wird. *Verschieden* ist jedoch der Angriffs*ort:* beim Strophanthin *über*wiegend *extrarenal*, bei den Rindenhormonen überwiegend *renal*. Der verschiedene Angriffsort hat zur Folge, daß im einen Fall der *Kaliumhaushalt*, im anderen der *Natriumhaushalt* stärker beeinflußt wird. Denn

eine Abgabe von Kalium aus dem Gewebe, z. B. der Muskulatur, führt wegen des hohen Konzentrationsgefälles zwischen Zellinnerem und Interstitium sehr bald zu einem meßbaren Anstieg im Blutplasma und damit zu einer vermehrten Kaliumausscheidung, während die Einwanderung von Natrium in die Zelle den hohen Natriumgehalt des Blutplasmas prozentual weit weniger beeinflußt. Der Kalium-Natriumaustausch in der Niere, zwischen Tubuluszelle und Tubuluslumen, steht demgegenüber vorwiegend im Dienste der Natriumrückresorption.

Die in Tab. 1 und 2 dargestellten Versuche, aus denen hervorgeht, daß Strophanthin die Natriumausscheidung epinephrektomierter Ratten nicht hemmt, dürften die Erklärung dafür sein, daß es uns — im Gegensatz zu Zwemer u. Mitarb. — nicht gelang, die Überlebenszeit epinephrektomierter Ratten durch tägliche Strophanthinbehandlung signifikant zu verlängern, während dies durch Docabehandlung oder durch Verfütterung einer natriumreichen Kost bei unseren epinephrektomierten Tieren ohne weiteres möglich war. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit Versuchen von Dorfmann an epinephrektomierten Mäusen.

Zwemer nimmt ferner an, daß die Empfindlichkeit epinephrektomierter Tiere gegenüber toxischen Strophanthinwirkungen *vermindert* ist. Unsere Versuche ergaben demgegenüber eine erhebliche *Toxicitätssteigerung*. Bemerkenswert ist, daß dabei die toxische Wirkung auf das *Herz* um das 10fache zunimmt, während die extracardiale Lähmungswirkung auf die *Skeletmuskulatur* nur um das 3fache gesteigert ist. Das Herz scheint demnach wesentlich empfindlicher auf einen Mangel an Rindenhormonen zu reagieren als die Skeletmuskulatur. Die höhere Empfindlichkeit epinephrektomierter Ratten ist sicher nicht allein durch eine Störung des Elektrolythaushaltes zu erklären, etwa in Parallele zur Adynamie adrenalektomierter Tiere (Fleckenstein) durch einen Kaliumanstieg im Serum; denn es ist bekannt, daß die Herzgiftigkeit des Strophanthins im Gegenteil durch *Erhöhung* des Kaliumspiegels im Serum vermindert wird (Baker; Hazard; Enselberg) und bei erniedrigtem Kaliumspiegel erhöht ist (Lown; Kühns). Auch ist anzunehmen, daß die Ratten, die bei der natriumreichen Kost sich in gutem Allgemeinzustand befanden, einen annähernd ausgeglichenen Elektrolythaushalt besaßen. Die höhere Empfindlichkeit dürfte eher durch eine nach der Epinephrektomie auftretende Störung von Phosphorylierungsprozessen und den Mangel an energiereichen Phosphaten zu erklären sein.

Zusammenfassung

1. k-Strophanthin bewirkt an nebennierenlosen Ratten ebenso wie an normalen Ratten eine Zunahme des Kaliumgehaltes im Serum und eine Abnahme des Kaliumgehaltes im Skeletmuskel. Die Natriumwerte verhalten sich spiegelbildlich.

2. Die renale *Kaliumausscheidung* ist nach k-Strophanthin bei epinephrektomierten und normalen Ratten in gleicher Weise erhöht. Eine Hemmung der Natriumausscheidung und eine wasserdiuretische Wirkung tritt jedoch nur bei Normaltieren, nicht bei epinephrektomierten Tieren auf.

3. Die *Toxicität* des k-Strophanthins ist bei epinephrektomierten Ratten stark erhöht, obwohl diese bei natriumreicher Kost äußerlich keine Insuffizienzerscheinungen zeigen und sich in gutem Allgemeinzustand befinden: die toxische Wirkung auf das Herz nimmt um das 10fache, die extracardiale Lähmungswirkung auf die Skeletmuskulatur um das 3fache zu. Die höhere Empfindlichkeit epinephrektomierter Ratten gegenüber der muskellähmenden Wirkung des Strophanthins ist als Test auf die Vollständigkeit der Epinephrektomie geeignet.

4. Die Unterschiede der Strophanthinwirkung und der Wirkung der Nebennierenrindenhormone auf den Mineralstoffwechsel werden erörtert.

Literatur

Barker, J. B. E.: Brit. J. Pharmacol. **2**, 259 (1947).—Bode, H., u. K. Greeff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 436 (1956). — Burn, J. H., D. J. Finney and L. G. Goodwin: Biological Standardization 2. Aufl. 1952, Oxford University Preß, Amen House, London E. C. 4. — Dessaulles, P., J. Tripod u. W. Schuler: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 1088. — Dorfmann, R. I.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **43**, 489 (1940). — Enselberg, C. D., H. G. Simmons and A. A. Mintz: Amer. Heart J. **39**, 713 (1950). — Fleckenstein, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch, Heidelberg: Springer 1955. — Gardner, L. I., H. Bermann and H. Wendler Dean: Endocrinology (Springfield, Ill.) **55**, 417 (1954). — Greeff, K.,u.E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 103 (1955). — Greeff, K.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **22**, 312 (1956); Dtsch. med. Wschr. **1956**, 666. — Gross, F.: Klin. Wschr. **1956**, 929. — Hazard, R., et J. Hazard: C. r. Soc. Biol. (Paris): **146**, 832 (1952). — Howell, D. S., and O. Davis: Amer. J. Physiol. **179**, 359 (1954). — Kühns, K., u. R. Albrecht: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **22**, 318 (1956). — Kuschinsky, G., u. H. Langecker: —Biochem. Z. **318**, 164 (1948). Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). Lown, B., I. M. Weller, N. F. Wyatt, Hoinge and J. P. Merrill: J. Clin. Invest. **31**, 648 (1952). — Matchett, P. A., and J. A. Johnson: Federat. Proc. **13**, 384 (1954). — Metzler, A. v.: Arch. Kreislaufforsch. **17**, 56 (1950). — Metzler, A. v., u. K. Greeff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 352 (1954). — Moskopf, E., u. H. Sarre: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **19**, 283 (1953); **21**, 388 (1955). — Pitts, R. F.: Josiah Macy Found. Conference III, Adrenal Cortex, New York 1951. — Schatzmann, H. J.: Helvet. physiol. Acta **11**, 346 (1953). — Schatzmann, H. J., and P. N. Witt: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 501 (1954). — Seldin, D. W., L. G. Welt and J. Cort: J. Clin. Invest. **30**, 673(1951). — Zwemer, R. L., and B. E. Lowenstein: Science (Lancaster, Pa.) **91**, 75 (1940). — Zwemer, R. L., B. E. Lowenstein and K. L. Pines: Endocrinology (Springfield, Ill.) **27**, 945 (1940).

Priv.-Dozent Dr. K. Greeff,
Pharmakol. Institut der Univ. Frankfurt/Main Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 401—406 (1957)

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. B. Korpássy) und der I. Medizinischen Klinik (Vorstand: Prof. Dr. G. Hetényi) der Universität Szeged, Ungarn

Die Wirkung des Cortisons auf die Gewebespeicherung der Methylcellulose

Von

Éva Horváth, K. Kovács und A. Benkő

(Eingegangen am 17. Juni 1957)

Im Laufe der experimentellen Untersuchungen mit den Nebennierenrindenhormonen wurde bekannt, daß das Cortison die Funktion des reticuloendothelialen Systems (RES) zu beeinflussen vermag. So haben Newsom, Darrach u. a. Autoren[23,5,10,12,13,3,4] unter verschiedenen Versuchsbedingungen gefunden, daß im Falle von Cortison-Behandlungen — je nach der angewandten Dosis — nach Antigenverabreichungen die Antikörperbildung stark herabgesetzt ist und nach Beobachtungen Crabbés[9] ist infolge der Cortisonbehandlung das Phagocytosevermögen der Makrophagen gegenüber den Krankheitserregern bedeutend reduziert. Die Angaben über den Einfluß des Cortisons auf die in den Organismus eingeführten — gewöhnlich makromolekularen Stoffe dagegen sind ziemlich widersprechend. Während nämlich nach manchen Mitteilungen die Cortison-Behandlung die Aktivität und das Speicherungsvermögen des RES weitgehend herabsetzt[15,24,27], wird nach anderen die Speicherungskapazität der Elemente des RES durch das Cortison nicht wesentlich verändert[2,19,20].

Wir hielten es deshalb für lohnenswert zu untersuchen, ob die Form und das Ausmaß der Speicherung der im Organismus außerordentlich dauerhaft gespeicherten, — auch hämatologische Veränderungen hervorrufenden[25] — Methylcellulose durch das Cortison irgendwie modifiziert wird, bzw. ob die Speicherung die durch Cortison verursachten histologischen Reaktionen beeinflußt.

Methodik

Die Versuche wurden an 32 bei einheitlicher Diät gehaltenen männlichen Albinoratten von 250—300 g Gewicht vorgenommen, die in vier Gruppen von je 8 Tieren geteilt wurden:

1. Unbehandelte Kontrollen
2. 8 Tage hindurch täglich 0,05 g Methylcellulose (5%ige wäßrige Lösung) i. p.
3. 8 Tage hindurch täglich 10 mg Cortison (Adreson, Organon) s. c.
4. 8 Tage hindurch täglich 0,05 g Methylcellulose i. p. + 10 mg Cortison (Adreson, Organon) s. c.

Während der Versuchsdauer wurde das Gewicht der Tiere täglich kontrolliert. Am 8. Tage wurden sämtliche Ratten durch Zerstörung der Medulla oblongata getötet, sofort seziert und die Organe in 4%igem Formalin fixiert. Nach sorgfältiger Präparation wurden die fixierten Organe auf der analytischen Wage auf 0,1 mg Genauigkeit gewogen, und ihr Gewicht — nach Umrechnung auf 100 g Körpergewicht — auch mathematisch ausgewertet. Nach Einbettung der Organe (Milz, Leber, Nieren, Nebennieren, Thymus, Lymphknoten, Netz) in Paraffin wurden 4—6 μ dicke Schnitte hergestellt und in Haematoxylin-Eosin gefärbt bzw. nach der von uns beschriebenen[16] Congorot-Färbung aufgearbeitet. Die Hypophysen wurden in Susa-Lösung fixiert, die Schnitte mit Hilfe der Goldberg-Chaikoffschen Trichromfärbung untersucht und auch quantitativ ausgewertet.

Ergebnisse

Die Ratten vertrugen die Behandlung während des Versuches gut. Wenn auch in der cortisonbehandelten Gruppe ein mäßiger Gewichtsverlust zu verzeichnen war, verloren wir doch kein einziges Tier.

Das Sektionsbild der mit Methylcellulose behandelten Ratten ist sehr charakteristisch. Am auffallendsten ist die ausgesprochene Milzvergrößerung mit dem zuckergußartigen grauweißen Belag auf der verdickten Kapsel. Ähnliche Veränderungen weist auch die Leberkapsel auf. Das Peritoneum hat stellenweise seinen Glanz verloren und das Netz ist mit Methylcellulose durchtränkt. Die Nieren lassen makroskopische Veränderungen nicht erkennen, die gelbfarbigen Nebennieren scheinen etwas größer als normalerweise. In der nur mit Cortison behandelten Gruppe fällt die ausgesprochene Atrophie der Milz auf, auch die Nebennieren sind verkleinert und von gelblichweißer Farbe.

Aus der die Organgewichte darstellenden Tabelle 1 geht hervor, daß die Methylcellulose-Behandlung eine bedeutende, auch mathematisch signifikante Milzvergrößerung zur Folge hat. Dagegen ist die cortisonbedingte — wohlbekannte — Milzatrophie in den simultan auch mit Methylcellulose behandelten Ratten infolge der hochgradigen Gewebsspeicherung nicht nachweisbar.

Das Nebennierengewicht der mit Methylcellulose behandelten Ratten zeigt eine mäßige Zunahme. Die cortisonbedingte Gewichtsabnahme der Nebennieren wird durch die Methylcellulose vollkommen verhindert. Auffallend ist, daß die Thymusdrüsen der mit Methylcellulose behandelten Ratten im Verhältnis zu denen der Kontrollen vergrößert sind.

Die mittels der Cortisonbehandlung hervorgerufenen geweblichen Veränderungen (lymphoide Atrophie, Veränderungen der Nebennierenrinde) werden durch die Methylcellulose-Gaben nicht im Wesen modifiziert.

Erwähnt sei noch, daß die Methylcellulose in der Hypophyse gegenüber den Kontrollen (5,77 %) eine mäßige Basophilie (8,97 %) und ausgesprochene Degranulation der basophilen Zellen bewirkt. Cortison verursacht eine bedeutende Anreicherung der basophilen Zellen (11,66 %),

welche durch die Methylcellulose-Dosierung nicht beeinflußt wird (11,91%).

Die zum Nachweis der in den Geweben gespeicherten Methylcellulose vorgenommene Congorot-Färbung hatte folgendes Ergebnis:

Am hochgradigsten ist die Speicherung in der gewaltig vergrößerten Milz. Die Methylcellulose wird zunächst von dem Cytoplasma der Reticulumzellen aufgenommen; kommt es aber zu einer hochgradigen Speicherung, so platzt die Zellwand, und die Makromoleküle werden auch extrazellulär nachweisbar. Häufig kann auch das Erscheinen von fremdkörperartigen Riesenzellen beobachtet werden, deren Plasma große Mengen der eingeführten Polymeren enthält. In der auf der verdickten Milzkapsel befindlichen Ablagerung sind Methylcellulose-haltige Höhlen nachweisbar. Die Reticulumzellen der vergrößerten Thymusdrüse und Lymphknoten nehmen ebenfalls intensiv an der Speicherung teil, während die lymphoiden Elemente, Follikel Methylcellulose nicht speichern.

Im Netz wird in kleineren und größeren Vacuolen sowie auch in fremdkörperartigen Riesenzellen — gewöhnlich in Begleitung entzündlicher Infiltrationen — die Methylcellulose wahrnehmbar.

In der Leber kann ausschließlich in den Kupfferschen Zellen und in der auf der Kapsel des Organs befindlichen Ablagerung gespeicherte Methycellulose nachgewiesen werden; das Parenchym selbst ist unbeschädigt, die Struktur entspricht in jeder Beziehung den normalen Verhältnissen.

In den Nebennieren, in erster Linie in den tieferen Schichten der Cortex

Tabelle 1

Nr.	Gruppe	Zahl der Tiere	Geschl.	Anfangsgew. (g)	Endgew. (g)	Nebennieren (mg)	Wahrscheinlichkeit	Milz (mg)	Wahrscheinlichkeit
I	Kontrolle	8	♂	255,8 ± 12,4*	285,1 ± 12,3	13,26 ± 0,52	—	289,9 ± 24,6	—
II	Methylcellulose	8	♂	276,7 ± 15,7	272,3 ± 14,3	19,31 ± 0,91	I/II $P < 0{,}001$	428,7 ± 33,1	I/II $0{,}001 < P < 0{,}01$
III	Cortison	8	♂	287,3 ± 14,7	242,6 ± 13,9	11,40 ± 0,23	I/III $0{,}01 < P < 0{,}02$	189,6 ± 16,7	I/III $0{,}001 < P < 0{,}01$
IV	Methylcellulose und Cortison	8	♂	282,1 ± 20,3	244,6 ± 13,7	14,93 ± 0,56	III/IV $P < 0{,}001$	361,1 ± 34,3	III/IV $P < 0{,}001$

* Mittelfehler

und vereinzelt in der Marksubstanz sind in manchen Fällen Methylcellulose-Schollen nachweisbar.

In der Hypophyse konnten auf eine Speicherung hindeutende Veränderungen nicht wahrgenommen werden.

In der Niere ist die Speicherung eine vorwiegend glomeruläre; die Endothelzellen der Glomerulusschlingen speichern, aber das Polymerisat ist auch in den Cappillaren selbst nachzuweisen. Hier ist zu bemerken, daß die histologisch nachweisbaren Methylcellulose-Mengen sehr verschieden sind; in der Regel wird nur in einem Teile der Glomeruli gespeichert, und auch diese nehmen nicht in dem gleichen Ausmaße an der Speicherung teil. Im tubulären System der nur mit Methylcellulose behandelten Ratten ist die gespeicherte Substanz nur in Spuren anzutreffen.

Durch die Behandlung mit großen Cortisongaben wird Ausmaß und Form der Speicherung — d. h. das oben beschriebene histologische Bild — in beachtenswerter Weise nur in der Niere modifiziert. Im Anschluß an die Cortisonverabreichung wird nämlich die glomeruläre Speicherung allgemeiner und vielerorts intensiver. In zahlreichen Glomeruli werden die Schlingen zu großen, runden, Methylcellulose enthaltenden Kugeln umgeformt und das Gewebsbild ähnelt oft dem beim Kimmelstiel-Wilson-Syndrom zu beobachtenden. (Natürlich ist diese Analogie nur eine formale, da es sich in unserem Falle nicht um eine Hyalinablagerung, sondern um die Speicherung einer künstlich eingeführten, makromolekularen Verbindung handelt). Im Falle der Cortisonbehandlung sind auch im Lumen der Tubuli häufiger Methylcellulose-haltige Cylinder zu beobachten.

Besprechung

Auf Grund unserer Untersuchungen kann festgestellt werden, daß bei Ratten die intraperitoneal eingeführte Methylcellulose — auf histologisch nachweisbare Weise — dauerhaft gespeichert wird. An der Speicherung sind in erster Linie die Elemente des RES — die Reticulumzellen von Milz, Kupfferschen Zellen der Leber, Thymus und Lymphknoten beteiligt, aber auch in der Niere kann die Substanz einwandfrei nachgewiesen werden. Es wurde ferner festgestellt, daß das Cortison in großen Dosen eine wesentliche Veränderung des Speicherungsbildes nur in der Niere zustande bringt.

Mehrere Literatur-Angaben berichten, daß im Anschluß an die Verabreichung makromolekularer Verbindungen (Plasmasubstituenten, PVP, Gelatine) das Bild einer „Speicherungs-Nephrose“ ([11,14,28]) zustande kommt und Brass[8] spielt in seiner Arbeit sogar darauf an, daß die Glomerulusveränderungen dem beim Kimmelstiel-Wilsonschen Syndrom bestehenden Bilde ähnlich sind.

Diese Gewebsveränderung wird nach unseren Erfahrungen durch Cortison noch gesteigert, und es ist ferner bekannt, daß auch die alleinige

Dosierung von Cortison und anderen corticoiden Hormonen nodulare oder diffuse Glomerulusveränderungen herbeiführt[6,7,26,29].

In Verbindung mit unseren Ergebnissen erhebt sich die Frage, weshalb das Cortison, welches in anderen Organen die Speicherung der Methylcellulose in wahrnehmbarer Weise nicht beeinflußt, die Glomerulusspeicherung steigert. Wir halten die Möglichkeit, daß bei der erwähnten Wirkung der Permeabilitätsveränderung eine Rolle zukäme, nicht für wahrscheinlich, da ja bekanntlich das Cortison die Capillardurchlässigkeit herabsetzt [21,22]. Dieser Effekt des Hormons kann u. E. vorwiegend auf zwei Wegen zur Geltung kommen: a) es kann irgendeine Phase des mehrphasigen Speicherungsmechanismus [17], (z. B. den aktiven Transport des Makromoleküls in die Zellen) beschleunigen oder b) die Steigerung der Speicherung ist eine Folge der mittels Cortison bewirkten Glomerulus-Läsion. Unsere Beobachtungen lassen eine endgültige Stellungnahme nicht zu, aber in Anbetracht dessen, daß die Vermehrung der histologisch nachweisbaren Substanzen nur in der Niere zu beobachten ist, erscheint uns die letztere Möglichkeit die wahrscheinlichere zu sein.

Ähnlich interessant und schwer zu erklären ist die von mehreren Autoren beschriebene[2,19,20] und von uns bestätigte Beobachtung, daß das Cortison, welches die in den Zellen des RES stattfindende Phagocytose von Krankheitserregern herabsetzt, die Speicherung der in den Organismus eingeführten kolloidalen Stoffe nicht beeinflußt. Zu diesem Problem kommt die von Jung u. Briziarelli[18] gemachte und durch unsere Ergebnisse bekräftigte Beobachtung, daß die Endothelzellen der Glomeruli — welche nach Bell[1] an der Phagocytose von Krankheitserregern nicht teilnehmen — gespeicherte Methylcellulose enthalten. In Verbindung mit dieser Frage ist — unseres Erachtens — die Annahme zulässig, daß die Krankheitserreger-Phagocytose und die Speicherung von den Organismus unmittelbar nicht schädigenden, makromolekularen Verbindungen zwei verschiedene, miteinander nicht streng in Analogie zu stellende Vorgänge sind.

Zusammenfassung

Verfasser untersuchten die Frage, wie das Cortison bei Ratten die Gewebespeicherung der Methylcellulose beeinflußt. Im Falle der Methylcellulose-Behandlung (8 Tage hindurch täglich 0,05 g Methylcellulose i. p.) findet in der Milz, in den Kupfferschen Zellen der Leber sowie in den Retikulumzellen der Thymus und Lymphknoten eine hochgradige Speicherung statt. In der Niere findet sich eine mäßige, insbesondere glomeruläre Speicherung. Eine wesentliche Veränderung des histologischen Speicherungsbildes bewirkt das Cortison (10 mg Adreson, Organon pro die) nur in der Niere, wo die glomeruläre Speicherung allgemeiner und ausgesprochener wird.

Es folgt eine kurze Erörterung zur Erklärung der Beobachtungen.

Literatur

[1] Bell, E. T.: Renal diseases. Philadelphia: Lea & Febiger 1950. — [2] Benacerraf, B., B. N. Halpern, G. Biozzi, and S. A. Benos: Brit. J. Exper. Path. **35**, 97 (1954). — [3] Berglund, K.: Acta endocrinol. (Copenh.) **21**, 359 (1956). — [4] Berglund, K.: Acta path. scand. (Copenh.) **38**, 311 (1956). — [5] Bjorneboe, M. D., E. E. Fischel and H. C. Stoerk: J. of Exper. Med. **93**, 37 (1951). — [6] Bloodworth, J. M. B., jr., and G. J. Hamwi: Diabetes **5**, 37 (1956). — [7] Bloodworth, J. M. B., jr., and G. J. Hamwi: Amer. J. Path. **31**, 167 (1955). — [8] Brass, K.: Frankf. Z. Path. **63**, 95 (1952). — [9] Crabbé, J.: Helvet. med. Acta **22**, 123 (1955). — [10] Dews, P. B., and C. F. Code: J. of Immun. **70**, 199 (1953). — [11] Fresen, O., u. H. Weese: Beitr. path. Anat. **112**, 44 (1952). — [12] Germuth, F. G., jr., B. Ottinger and J. Oyama: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 188 (1952). — [13] Germuth, F. G., jr., J. Oyama and B. Ottinger: J. of Exper. Med. **94**, 139 (1951). — [14] Hartmann, F. W.: Arch. Surg. **63**, 728 (1951). — [15] Heller, J. H.: Federat. Proc. **12**, 65 (1953). — [16] Horváth, É., K. Kovács u. A. Benkő: Acta Histochem. **3**, 273 (1957). — [17] Jancso, N.: Speicherung. Stoffanreicherung im Retikuloendothel und in der Niere. Budapest: Akademiai Kiado, 1955. — [18] Jung, H. P., u. G. Briziarelli: Virchows Arch. **326**, 1 (1954). — [19] Magee, P. N., and A. A. Palmer: Brit. J. Exper. Path. **34**, 458 (1954). — [20] Mené, G.: Riv. Ist. sieroter. ital. **28**, 203 (1953). — [21] Menkin, V.: Amer. J. Physiol. **129**, 691 (1940). — [22] Menkin, V.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **51**, 39 (1942). — [23] Newsom, S. E., and M. Darrach: Canad. J. Biochem. Physiol. **32**, 372 (1954). — [24] Nicol, T., and R. S. Snell: Nature (Lond.) **174**, 554 (1954). — [25] Palmer, J. G., E. J. Eichwald, G. E. Cartwright and M. M. Wintrobe: Blood 8, 72 (1953). — [26] Rich, A., M. Bertthrong, J. L. Bennett, jr., T. H. Cochran, P. C. Griffith and D. C. McGoon: Tr. Assoc. Amer. Physicians **64**, 257 (1951). — [27] Spain, D. M., N. Molomut and A. Haber: Science (Lancaster, Pa.) **112**, 335 (1950). — [28] Traenckner, K.: Z. exper. Med. **123**, 101 (1954). — [29] Wilens, S. L., and H. H. Stumpf: Amer. J. Path. **31**, 275 (1955).

Frau Dr. Éva Horváth, Pathologisch-Anatomisches Institut der Universität Szeged/Ungarn

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 407—418 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Wirkung hoher Dosen des oralen Antidiabeticum D 860 („Artosin", „Rastinon") auf neuromotorische Funktionen, besonders des Rückenmarkes

Von
E. Gerstenberg, A. Hasselblatt und G. Schmidt

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1957)

Frühere Untersuchungen (Hasselblatt u. Bludau) mit i.v. Dauerinfusionen von N-(4-methyl-benzolsulfonyl)-N-butylharnstoff = D 860 („Artosin", „Rastinon") am Kaninchen zeigten die Dosisabhängigkeit der blutzuckersenkenden Wirkung.

Der *rasche* Anstieg der D 860-Konzentration im Blut durch einmalige i.v. Injektion führt zu hyperglykämischen Reaktionen, die nach Mohnike u. Mitarb. eine toxische Wirkung hoher D 860-Dosen darstellen. Auch die von Scholz u. Bänder sowie Mohnike u. Hagemann beobachteten Krämpfe sind als eine direkte Wirkung von D 860 gedeutet worden. Sie treten nämlich bei normalen oder häufiger bei erhöhten Blutzuckerkonzentrationen auf. Sie sind daher nicht durch eine Hypoglykämie ausgelöst. Die Erscheinungsform dieser Krämpfe ließ Scholz u. Bänder eine cerebrale Genese annehmen, die auch durch autoptische Befunde von Mohnike u. Mitarb. wahrscheinlich gemacht wurde.

Bei einem *langsamen* Anstieg der D 860-Konzentration im Blut während einer i.v. Dauerinfusion tritt das Bild einer protrahierten Vergiftung auf. Selbst bei höchsten Dosen (1000 mg/kg) wurden dabei keine länger anhaltenden Hyperglykämien beobachtet. Unabhängig vom Verhalten der Blutzuckerkonzentration kommt es unter diesen Bedingungen zu einer fortschreitenden schlaffen Lähmung der Muskulatur. Als erstes Symptom dieses Vergiftungsbildes tritt beim Kaninchen deutlicher „head drop" ein. Nach einer Gesamtdosis von 800 mg/kg D 860 sind die Tiere mit Ausnahme der Atemmuskulatur vollkommen gelähmt. Sie liegen dabei flach auf der Seite; auf Schmerzreize bleibt jede Reaktion aus. Dieses Zustandsbild ist über Stunden zu beobachten. Durch i.v. Glucoseinjektionen oder -infusionen konnte der Blutzucker über Stunden auf

hyperglykämische Werte eingestellt werden. Dadurch gelang es jedoch nicht, das Vergiftungsbild zu beeinflussen. Die allgemeine Lähmung wurde gelegentlich unmittelbar ante exitum von flüchtigen klonischen Zuckungen unterbrochen. Die Tiere starben danach in einem kurzdauernden Streckkrampf.

Das Bild der protrahierten Vergiftung durch D 860 läßt an eine Schädigung zentralnervöser Funktionen denken. In einer gewissen Übereinstimmung mit diesen eigenen Erfahrungen stehen die Befunde von Houssay u. Penhos. Diese Autoren fanden ebenfalls blutzuckerunabhängige, neurotoxische Symptome nach hohen Dosen von D 860 an hypophysektomierten, epinephrektomierten und weitgehend pankreatektomierten Tieren. Im Vordergrund der Symptomatik standen Tremor, Würgen und Koordinationsstörungen. Die blutzuckersenkende Wirkung der Sulfonyl- und Sulfanilylharnstoffderivate ist nach klinischer (Franke u. Fuchs, Bertram, Bendfeldt u. Otto) und tierexperimenteller (Achelis u. Hardebeck, Lang u. Sherry, Becker, Buddecke u. Müller) Erfahrungen an das Vorhandensein eines noch funktionstüchtigen Inselorgans gebunden. Daher blieb bei den Versuchen von Houssay u. Penhos eine Blutzuckersenkung an pankreatektomierten Tieren aus. Die neurologischen Ausfälle traten hier bei normalen Blutzuckerwerten auf und waren durch Glucoseinjektionen ebenfalls nicht zu beeinflussen.

Die vorliegenden Untersuchungen haben die Analyse der durch D 860 veränderten Neuromotorik zum Ziel. Dabei kam es uns vor allem auf die Klärung folgender Fragen an:

1. Beeinflußt D 860 in hohen Dosen die Funktionen des Rückenmarkes?

2. Bestehen Beziehungen zwischen einer eventuellen Rückenmarkswirkung und den bekannten blutzuckersenkenden Effekten dieses Antidiabeticum?

3. Sind periphere Wirkungen von D 860 auf die motorische Endplatte oder den Muskel selbst für das Auftreten der schlaffen Lähmung verantwortlich zu machen?

Methodik

Wir hielten uns methodisch an die von Taugner u. Culp angegebene Versuchsanordnung. Als Versuchstiere dienten 20 Katzen im Gewicht von 1,8—4,5 kg. Die Mehrzahl der Tiere wurde in einer kurzen Äthernarkose nach Sherrington decerebriert und künstlich beatmet. Nach Absetzen der Äthernarkose vergingen bis zum Versuchsbeginn 2—3 Std. Bei 2 Versuchstieren wurde zusätzlich das Rückenmark in Höhe des 10. Thorakalsegmentes durchtrennt. Schließlich wurden Versuche an dekapitierten Katzen durchgeführt, wobei wir den Blutdruck durch eine Nor-Adrenalin Dauerinfusion auf eine Höhe von 120—160 mm Hg einregulierten.

Mittels einer in die A. carotis com. eingelegten Kanüle wurde der arterielle Blutdruck registriert. Kanüle und Schlauchsystem waren zur Verhinderung der Blutgerinnung mit einer Heparin-Ringer-Lösung gefüllt.

Der kontralaterale Streckreflex (CSR) und der homolaterale Beugereflex (HBR) wurden durch elektrische Reizung des zentralen Stumpfes des N. ischiadicus sin. ausgelöst. Rechter N. ischiadicus und linker N. femoralis waren vorher durchschnitten. Gleichzeitig prüften wir den Erfolg der direkten und indirekten Muskelreizung

am M. gastrocnemius. Gereizt wurde mit dem Rechteckimpulsgenerator der Fa. Medeor, Hamburg[1]. Die Reize erfolgten alle 2 min für die Dauer von 2 sec mit einer Impulsfrequenz von 30/sec; die Dauer der Einzelimpulse betrug 0,2 bis 0,5 msec und die Impulsstärke 2—6 Milliamp.

Zur Fixierung der Präparate wurden durch die Ligg. interspinalia und durch die Kniegelenke zwei Stahlnadeln geführt und in Kirschnerschen Drahtextensionsbügeln eingespannt. Die Reflexe wurden mit semiisometrischen Hebeln, die über Rollen mit den Fußgelenken in Verbindung standen, auf einem Rußkymographion registriert. Durch Veränderung der Hebelübertragung konnten die Reflexausschläge auf die gewünschte Größe einreguliert werden.

Der Wirkstoff N-(4-methyl-benzolsulfonyl)-N-butylharnstoff[2] wurde in einer konstanten Dosierung von 270 mg/kg/Std mit dem Infusionsgerät nach Hoffmann u. Witte in eine V. jugularis ext. infundiert. Dabei war die Konzentration der D 860-Lösung (4—10%) so gewählt, daß in allen Versuchen 10 cm^3 in der Stunde einliefen. Während der Versuche wurde die Blutglucosekonzentration alle 20 min nach Hagedorn-Jensen in Doppelanalysen bestimmt. Die Blutentnahme erfolgte mit einem dünnen Polyvinylkatheter, den wir durch die A. carotis bis in den Aortenbogen vorgeschoben hatten, um für die Blutzuckerbestimmung sicher frisch durchmischtes Blut zu erhalten.

Um die Frage zu entscheiden, ob bei einer extremen Vergiftung mit D 860 zuerst eine Beeinträchtigung der Atmung oder der Kreislauffunktionen eintritt, wurden drei ergänzende Versuche an Katzen in Chloralose-Urethan-Narkose (80 bzw. 250 mg/kg s.c.) durchgeführt. Neben arteriellem Druck, CSR und indirekter Muskelreizung registrierten wir in diesen Versuchen noch Atemvolumen und Atemfrequenz.

Ergebnisse

1. Polysynaptische Reflexe unter dem Einfluß von D 860. Bei intravenöser Dauerinfusion von 270 mg/kg/Std D 860 kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme des CSR (Abb. 1). Es waren Dosen von 376 ± 176 mg/kg i.v. notwendig, um den kontralateralen Streckreflex an decerebrierten Tieren vollständig zu lähmen (10 Versuche). Vergleichende Untersuchungen an dekapitierten bzw. despinalisierten Tieren (je 2) ergaben, daß die Lähmung des CSR unter diesen abgeänderten Versuchsbedingungen in dem gleichen Dosierungsbereich erfolgt. (Notwendige Dosen bis zur vollen CSR-Lähmung: Dekapitierte Katzen 397 mg/kg, despinalisierte Katzen 400 mg/kg D 860 i.v.)

Falls D 860 spezifisch an den Synapsen des Rückenmarkes angreift, wäre zu erwarten, daß ein Reflex mit weniger Synapsen als der CSR eine geringere Empfindlichkeit besitzt. Es zeigte sich aber, daß der synapsenärmere homolaterale Beugereflex mit annähernd gleichen Dosen von D 860 gelähmt wird. Die zur Reflexlähmung erforderlichen Dosen betrugen für den HBR 455 ± 210 mg/kg i.v. während der CSR nach 367 ± 167 mg/kg i.v. D 860 völlig verschwindet.

[1] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Reizgerätes als Leihgabe.

[2] Wir danken den Farbwerken Hoechst für die Überlassung von Versuchsmaterial.

Daß es sich bei diesen Reflexlähmungen tatsächlich um zentralnervöse Wirkungen von D 860 handelt, konnte mit der Versuchsanordnung, bei der eine nervös mit dem Rückenmark verbundene Hinterextremität von einer Spenderkatze isoliert durchblutet wurde, gezeigt werden. Dabei ist ein peripherer Angriff von D 860 am Muskel selbst

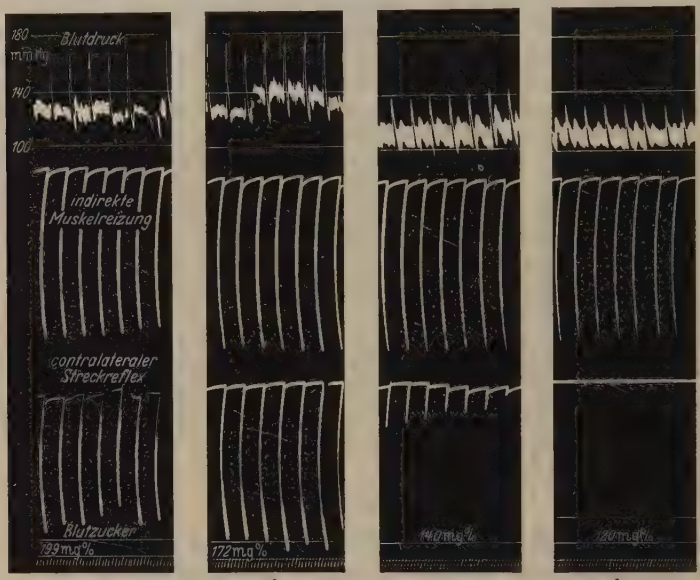


Abb. 1. Depression des polysynaptischen kontralateralen Streckreflexes unter D 860. Decerebrierte Katze. a vor D 860-Infusion, b nach 80 mg/kg D 860 i.v. Geringfügige Steigerung des CSR. c nach 370 mg/kg D 860 i.v. beträgt der Reflexausschlag nur noch etwa 20% der Ausgangsgröße. d vollständige Lähmung des CSR nach 535 mg/kg D 860 i.v.; der Erfolg indirekter Muskelreizung ist noch nicht verändert

oder der motorischen Endplatte mit Sicherheit auszuschließen. Trotzdem erfolgte die Reflexdepression in gleicher Weise wie am nicht isoliert durchströmten Bein (Abb. 2). Mit 360 mg/kg D 860 trat ebenso eine völlige Lähmung des CSR ein.

Die durch D 860 verursachten Reflexausfälle sind durch kleine Strychnindosen (0,02—0,04 mg/kg i.v.) teilweise aufhebbar.

2. Wirkung von D 860 auf den Erfolg der indirekten Muskelreizung. Für die Beurteilung der lähmenden Wirkung hoher Dosen von D 860 interessierte die Frage, wieweit auch periphere Einflüsse eine Rolle spielen. Es zeigte sich, daß in der Dosierung, die zur Lähmung der polysynaptischen Reflexe führt, die indirekte Muskelreizung noch nicht beeinflußt wird. Erst im weiteren Verlauf der Infusion von D 860 kommt es dann doch zu einer Abnahme der Zuckungsgröße des Muskels. Bei einer infundierten Dosis von 715 ± 214 mg/kg D 860 i.v. betrug der Ausschlag nur noch 20% der Ausgangsgröße. Eine vollständige Lähmung

des indirekt gereizten Muskels wurde in unseren Versuchen meist nicht erreicht. Im Endstadium der Vergiftung tritt nämlich ein Kollaps ein, der schließlich auch mit Nor-Adrenalininfusionen nicht mehr zu kupieren ist.

Der Erfolg direkter Muskelreizung ist dagegen auch bei diesen hohen Dosen kaum verändert. Dies spricht dafür, daß die Abnahme der Kontraktion des indirekt gereizten Muskels durch einen Angriff von D 860

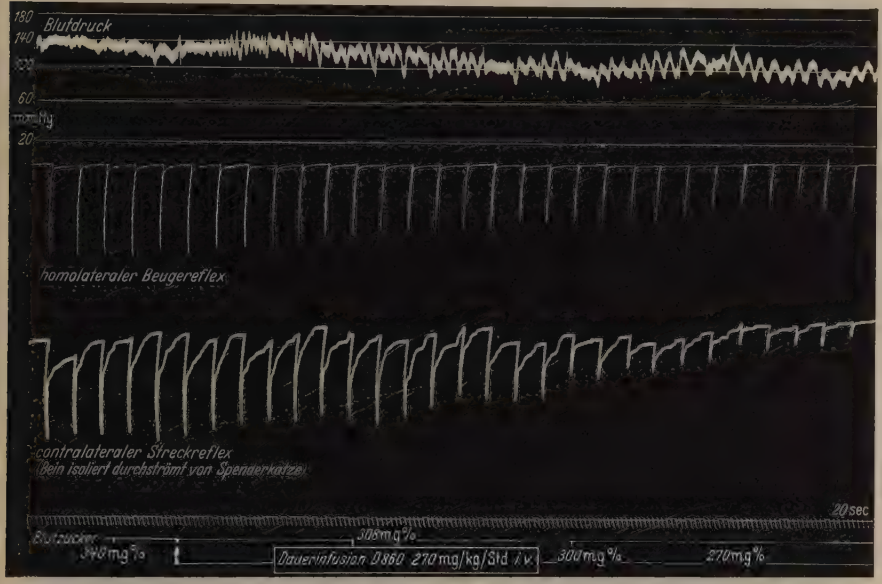


Abb. 2. Decerebrierte Katze. Einfluß von D 860 auf den homolateralen Beugereflex. Gleichzeitige Registrierung des kontralateralen Streckreflexes auf der Gegenseite am isoliert von einer Spenderkatze durchströmten Bein. Die Reflexlähmung erfolgt bei Ausschaltung peripherer Angriffsmöglichkeiten in gleicher Weise

an der neuromuskulären Synapse verursacht ist. (Allerdings ist zu berücksichtigen, daß auch bei direkter Reizung des intakten Muskels die Kontraktion ebenfalls teilweise durch eine Erregung der motorischen Endplatte erfolgt.) Zur pharmakologischen Analyse einer Endplattenlähmung kann man Prostigmin heranziehen. In allen Fällen, bei denen ein curareartiger Lähmungstypus vorliegt, ist eine antagonistische Wirkung durch Prostigmin zu erwarten. Deshalb gaben wir in unseren Versuchen, sobald die Muskelkontraktion bei indirekter Reizung auf etwa 20% des Ausgangswertes abgesunken war 0,05—0,1 mg/kg Prostigmin i.v. In allen Versuchen kam es danach zu einer Vergrößerung der Muskelzuckung auf 40—60% des Ausgangswertes (Abb. 3). Kontrollversuche ergaben, daß bei unseren supramaximalen Reizbedingungen am unbehandelten Muskel mit diesen Prostigmindosen keine Veränderung der Muskelzuckung eintritt.

3. Das Verhalten von Kreislauf und Atmung während der Dauerinfusion von D 860. Regelmäßig trat in unseren Versuchen ½—1 Std nach Beginn der Infusion mit D 860 (270 mg/kg/Std) ein Blutdruckanstieg um 10—20 mm Hg auf. In einem Versuch wurde die Infusion durch eine viertelstündlich wiederholte Injektion von 67 mg/kg D 860 ersetzt. Bei dieser Applikationsweise traten unmittelbar nach jeder der ersten Injektionen Blutdrucksteigerungen bis zu 80 mm Hg auf (von

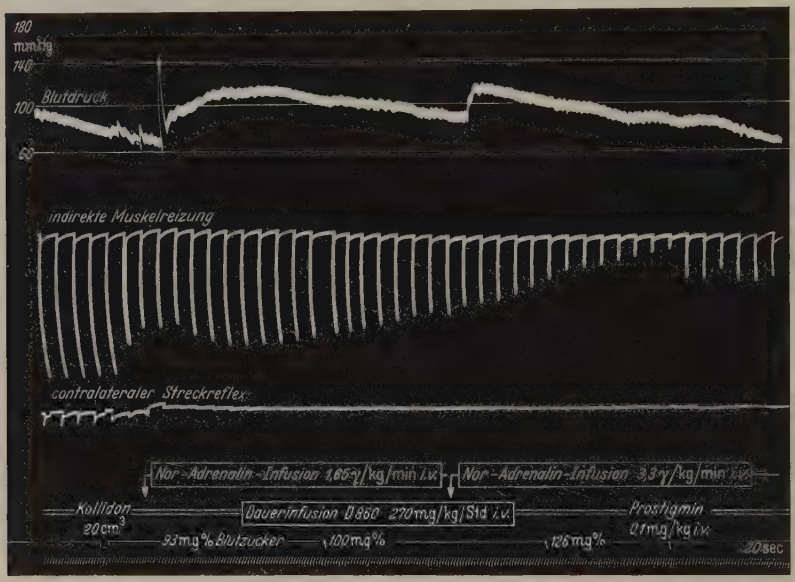


Abb. 3. Endstadium einer i.v. Vergiftung mit D 860. Decerebrierte Katze. Vorbehandlung mit 500 mg/kg D 860 i.v. Die Zuckungsgröße des indirekt gereizten Muskels nimmt nach 650 mg/kg D 860 ab. Nach 810 mg/kg D 860 i.v. ist die Zuckungsgröße des Muskels auf 10% der Ausgangsgröße zurückgegangen. Teilweise Aufhebung durch 0,1 mg/kg Prostigmin i.v. Zur Stützung des Kreislaufs Nor-Adrenalininfusionen. Näheres vgl. im Text

120 auf 200 mm Hg). Diese Kreislaufreaktionen wurden im weiteren immer schwächer, bis nach einer Gesamtdosis von 540 mg/kg D 860 i.v. kein Blutdruckanstieg nach der Injektion mehr auftrat.

Im weiteren Verlauf der Infusionen kam es zu einem sekundären allmählichen Blutdruckabfall, der bei höheren Dosen von D 860 regelmäßig in einen Kollaps überzugehen drohte. Erreichte der Blutdruck Werte von 70 mm Hg, so gaben wir Nor-Adrenalin als Dauerinfusion in einer Dosierung, die den Blutdruck auf einer Höhe von 100 bis 120 mm Hg halten sollte. Dabei mußte die zunächst ausreichende Dosis von 1,5 γ/kg/min im Fortgang des Versuches immer wieder erhöht werden, bis zuletzt auch Dosen von 12 γ/kg/min den Kollaps nicht mehr aufhalten konnten.

Die Kreislaufreflexe, die bei der elektrischen Reizung des zentralen Ischiadicusstumpfes zu Blutdruckschwankungen von 20—40 mm Hg führten, ließen im Verlauf der fortschreitenden Vergiftung ebenfalls immer mehr nach und traten gegen Versuchsende nicht mehr auf.

Die Tiere waren in der Mehrzahl der Versuche künstlich beatmet worden, um einen eventuellen Fehler durch mangelhafte O_2-Belüftung zu vermeiden. Um die Frage nach der endgültigen Todesursache bei Vergiftung mit höchsten Dosen von D 860 zu klären, führten wir auch drei Versuche an spontanatmenden Tieren durch.

Da die Beeinträchtigung der polysynaptischen Reflexe vermutlich auf eine Wirksamkeit von D 860 am Rückenmark zurückzuführen ist, lag die Annahme nahe, daß höhere Dosen auch die lebenswichtigen Zentren in der Medulla oblongata schädigen. So ergab sich dann auch in unseren Versuchen, daß bei einer Dosis von 700 mg/kg D 860 i.v. Unregelmäßigkeiten der Atmung auftraten, die sehr bald in eine periodische Atmung vom Cheyne-Stokes-Typ übergingen. Dabei bleibt bis kurz vor dem Atemstillstand das Atemvolumen konstant. Eine spezifische Wirkung auf das Atem- oder das Kreislaufzentrum ließ sich nicht feststellen. Wir versuchten zu analysieren, ob im Endstadium der D 860-Vergiftung ein Versagen des Kreislaufs oder der Atmung primär im Vordergrund steht. Unsere Versuche ergaben, daß beide Systeme etwa gleichartig und gleichzeitig versagen. Weder konnte durch künstliche Atmung zum Zeitpunkt der Atemstörung der gleichfalls schon drohende Kollaps verhindert werden, noch war es andererseits möglich, die schon bestehende periodische Atmung durch Stützung des Kreislaufs mittels Nor-Adrenalininfusionen zu normalisieren und den Atemstillstand hinauszuzögern. So scheint es sich nicht um eine spezifische Wirkung auf einzelne Zentren zu handeln, sondern eher um eine allgemeine etwa gleichmäßige Schädigung vegetativer Regulationsgebiete. Die tödliche Dosis betrug bei diesen drei Versuchen 798 $\pm$ 114 mg/kg D 860 i.v.

4. Blutzuckerveränderungen während protrahierter Zufuhr von D 860. Da D 860 den Blutzucker senkt, liegt es nahe, die Beeinträchtigung von Nerven- oder Muskelfunktionen mit der hypoglykämisierenden Wirkung des Stoffes in Zusammenhang zu bringen. Besonders vom Zentralnervensystem weiß man, daß ein starkes Absinken des Blutzuckers unter einen kritischen Wert eine physiologische Funktion nicht mehr zuläßt.

Die in Abständen von 20 min durchgeführten Blutzuckerbestimmungen ergaben, daß zwar unter dem Einfluß der i.v. Dauerinfusion von D 860 die Blutglucosekonzentration absinkt, bei vollständiger Lähmung des CSR aber noch über 140 mg-% beträgt und den Wert von 60 mg-% auch bis zum Tode nicht unterschreitet. So kann also eine Beziehung zwischen der Reflexlähmung und dem blutzuckersenkenden Einfluß von D 860 wohl ausgeschlossen werden. Gegen eine solche

Abhängigkeit spricht auch die Tatsache, daß der Blutzuckeranstieg, der am Ende des Versuches nach der — aus Kreislaufrücksichten erforderlichen — Nor-Adrenalininfusion eintrat, zu keiner Veränderung der beeinträchtigten Reflexe oder Muskelkontraktion nach indirekter Reizung führte. Die Veränderungen der Blutglucosekonzentrationen sind in Abb. 4 graphisch dargestellt.

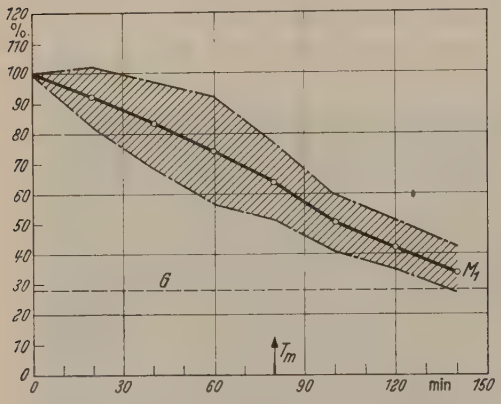


Abb. 4. Graphische Darstellung der zeitlichen Veränderungen der Blutglucosekonzentration unter D 860-Dauerinfusion. Die Blutzuckerwerte sind in Prozent des Ausgangswertes zu Beginn des Versuches (= 100%) angegeben. M_1 Mittelwerte der Blutzuckerkonzentrationen aus 13 Versuchen; schraffiert: Streuungsbereich der Einzelwerte; G Kritischer Grenzwert, oberhalb dessen eine gestörte Funktion des ZNS mit Sicherheit nicht blutzuckerbedingt ist; T_m Zeitpunkt der Reflexlähmung. Die Abbildung zeigt, daß kein Zusammenhang zwischen Blutzuckersenkung und Reflexdepression besteht

Diskussion

Bevor die Frage erörtert werden soll, wie die Reflexlähmung durch hohe Dosen des oralen Antidiabeticum D 860 zu erklären ist, sind zunächst folgende Punkte kritisch zu besprechen:

1. Zusammenhänge zwischen Reflexbeeinträchtigung und der Kreislaufwirkung.

2. Abhängigkeit der durch D 860 veränderten Neuromotorik von der Blutglucosekonzentration.

Ad. 1. Es ist bekannt, daß eine physiologische Rückenmarksfunktion nur oberhalb einer kritischen Blutdruckgrenze möglich ist. Von Koll wird ein erforderlicher arterieller Blutdruck von 50 mm Hg als Schwellenwert angegeben. Da hohe Dosen von D 860 einen starken Blutdruckabfall verursachen, der schließlich zum Kreislaufkollaps führt, wäre in diesem Stadium der Vergiftung schon hieraus eine Abnahme der Reflextätigkeit zu erklären. In unseren Versuchen waren aber die Lähmungserscheinungen schon zu einem Zeitpunkt zu beobachten, als der Blutdruck noch weit oberhalb dieses kritischen Grenzwertes lag. Überdies wurde auch im weiteren Verlauf des Versuches mit einer Nor-Adrenalininfusion begonnen, wenn der arterielle Blutdruck unter 70 mm Hg absank.

Der von uns regelmäßig registrierte Blutdruckanstieg zu Beginn der i.v. Infusion von D 860 ist möglicherweise durch eine Adrenalinausschüttung bedingt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß gleichzeitig eine geringe Frequenzzunahme des Herzens erfolgte. In diesem Zusammenhang muß auch erwähnt werden, daß derartige Adrenalinausschüttungen zu Veränderungen der Reflextätigkeit führen können. Die Beugereflexe werden durch Adrenalin im Sinne einer Depression beeinflußt, während die Streckreflexe gleichzeitig stimuliert werden (Bernhard u. Skoglund; Bülbring, Burn u. Skoglund u. a.). Diese Wirkung von Adrenalin kann auch den unerwartet geringen Unterschied in der Empfindlichkeit des kontralateralen Streckreflexes und des homolateralen Beugereflexes verständlich machen (vgl. S. 409). Die Adrenalinhemmung des HBR würde also die größere Resistenz dieses Reflexes gegen D 860 verdecken, während der an sich labilere CSR

gleichzeitig unter der Adrenalinstimulierung relativ widerstandsfähig erscheint. — Zu denken wäre bei der Erklärung des oben erwähnten Blutdruckanstiegs ferner auch an eine flüchtige Erregung des Vasomotorenzentrums; ein Hinweis auf erregende Wirkungen kleiner Dosen auf das ZNS ist auch die von uns in 3 Versuchen an decebrierten Tieren festgestellte vorübergehende Steigerung der polysynaptischen Reflexe zu Beginn der Infusion von D 860 (vgl. auch Abb. 1).

Ad. 2. Der Stoffwechsel des ZNS ist auf eine ausreichende Zufuhr von Kohlenhydraten angewiesen. Sinkt die Blutzuckerkonzentration unter eine kritische Schwelle von 50 mg-% (Evans), so reicht die Energiezufuhr nicht mehr aus, um eine physiologische Funktion des ZNS zu gewährleisten. Die beobachtete Reflexlähmung nach der Infusion von D 860 läßt sich aber mit der gleichzeitigen blutzuckersenkenden Wirkung nicht in Zusammenhang bringen. Denn trotz der fallenden Tendenz der Blutzuckerveränderungen wurde die kritische Schwelle nie erreicht oder gar unterschritten.

Die zum Teil sehr hohen Blutzuckerwerte zu Beginn der Versuche sind noch als eine Folge der Äthernarkose aufzufassen. So wurden u. a. von Wymer nach Äther-Tropfnarkosen Blutzuckersteigerungen von 200—400 mg-% beobachtet. Diese Hyperglykämien sind auffallend lang (bis zu 48 Std). Der zu Anfang der Versuche nur sehr wenig ausgeprägte Abfall der Blutzuckerkonzentration hängt vermutlich mit der oben diskutierten Adrenalinausschüttung zusammen. Bänder u. Scholz sowie Houssay u. Penhos haben gefunden, daß die Blutzuckersenkung durch D 860 an epinephrektomierten Tieren wesentlich ausgeprägter ist als am intakten Tier. Dieser Befund bestätigt die Annahme, daß hierbei Adrenalin freigesetzt worden ist.

Nachdem weder die Veränderungen der Blutglucosekonzentration noch der Kreislaufverhältnisse für die Reflexlähmung verantwortlich gemacht werden konnten, ist vielmehr eine Beeinflussung der Neuromotorik selbst durch hohe Dosen von D 860 anzunehmen. Im wesentlichen sind dafür drei Mechanismen bzw. Angriffspunkte in Erwägung zu ziehen:

1. Stimulierung von hemmenden bzw. Dämpfung von erregenden Impulsen reflexsteuernder Zentren in höheren Abschnitten des ZNS.

2. Fortschreitende Blockierung der Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte.

3. Direkte Wirkung auf das Rückenmark.

Ad. 1. Eine Reflexdepression wäre u. a. durch eine Erregung reflexhemmender Zentren in höheren Abschnitten des ZNS erklärbar, obwohl diese Deutungsmöglichkeit nicht allgemein anerkannt ist. Um aber derartige eventuelle Einflüsse sicher auszuschalten, führten wir die oben erwähnten Versuche an dekapitierten und despinalisierten Tieren durch. Eine auf einer Stimulierung von hemmenden oder auf einer Dämpfung von fördernden Impulsen beruhende Reflexbeeinträchtigung käme bei dieser Versuchsanordnung, bei der alle Bahnen zwischen höheren Abschnitten des ZNS und den Lumbal- und Sakralsegmenten unterbrochen sind, nicht zur Wirkung. Da es auch unter diesen Versuchsbedingungen zu einer Abnahme und später zur Lähmung der polysynaptischen Rückenmarksreflexe kommt, scheidet dieser Mechanismus zur Erklärung der Reflexdepression durch D 860 aus.

Ad. 2. Wie aus unseren Versuchen (vgl. Ergebnisse 2) hervorgeht, beeinflußt D 860 in höchsten Dosen auch die Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte. Diese „curarisierende" Wirkung von D 860, die durch Prostigmin teilweise aufzuheben ist (vgl. Abb. 3), könnte auch eine Reflexbeeinträchtigung durch wesentlich geringere Dosen erklären. Für Curare ist dieser Mechanismus als Vulpian-Effekt bekannt.

Nach Erdmann (1956) erklärt sich der Ausfall von Willkürmotorik und Reflextätigkeit bei Curare-Dosen, welche die indirekte Muskelreizung noch nicht beeinflussen, aus der Tatsache, daß eine Erregung sämtlicher Nervenfasern nur bei künstlicher supramaximaler Reizung erfolgt. Die physiologischen Impulse aus dem Rückenmark stellen dagegen immer nur eine submaximale Erregung dar, bei der sich ein partieller Ausfall der motorischen Endplatten schon sehr frühzeitig manifestiert als Lähmung, während eine supramaximale indirekte Reizung die Muskelfunktion noch unverändert erscheinen läßt.

Die Versuche an einer isoliert durchströmten Extremität sprechen jedoch eindeutig gegen die Annahme, daß die Reflexbeeinträchtigung durch D 860 analog zum Vulpian-Effekt durch eine Wirkung auf die motorische Endplatte zu erklären ist. Obwohl der Wirkstoff selbst nicht an den Muskel gelangen konnte, trat der Reflexausfall im gleichen Dosierungsbereich wie bei der sonst gewählten Versuchsanordnung ein. Dieser Befund bestätigt gleichzeitig noch einmal, daß auch ein direkter Einfluß von D 860 auf den Muskel nicht als Ursache der Reflexdepression durch D 860 angesehen werden kann.

Für eine spezifische Wirkung von D 860 auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Muskulatur könnten nämlich Befunde von Miller u. Dulin sprechen. Diese Autoren fanden in ihren Versuchen unter D 860 im Gegensatz zu Insulin eine Abnahme des Muskelglykogens.

Ad. 3. Nachdem sich also weder eine pharmakologische Beeinflussung höherer Abschnitte des ZNS noch eine periphere Wirkung von D 860 als Ursache der Reflexlähmung erwiesen hatte, kann sie nur durch eine direkte Wirkung am Rückenmark bedingt sein. Für eine solche Annahme spricht auch die antagonistische Wirksamkeit von relativ kleinen Strychnindosen (0,02—0,04 mg/kg i.v.). Diese blockierende Wirkung von D 860 auf die Synapsen ist aber offenbar nicht auf den Bereich des Rückenmarks beschränkt. Vielmehr scheint eine Schädigung der Ganglienzellen bzw. ihrer synaptischen Funktionen allgemein vorzuliegen. Dies zeigt sich u. a. auch an dem Versagen der Atmungs- und Kreislaufzentren in der Medulla oblongata in den letzten Stadien der Vergiftung. In diese Vorstellung fügt sich schließlich auch die bei höchsten Dosen von D 860 beobachtete Abnahme der Muskelkontraktion bei indirekter Reizung — als Ausdruck einer beginnenden Lähmung auch der neuromuskulären Synapse — recht gut ein.

In diesem Zusammenhang wäre auch ein Vergleich mit der Toxikologie verwandter Sulfonamide von Interesse. Die i.v. tödlichen Dosen von Sulfapyridin und Sulfathiazol liegen mit etwa 1,0 g/kg in der gleichen Höhe wie die von D 860.

Eine eingehende Analyse über neurotoxische Wirkungen der Sulfonamide im akuten Versuch liegt nach unserer Kenntnis nicht vor. Bei chronischer Verabreichung konnten Bieter u. Mitarb. histologisch faßbare Schäden am Rückenmark mit Vacuolisierung und Myelinverlust nachweisen.

Über den genaueren biochemischen Mechanismus der Wirkung von D 860 auf das ZNS können wir aus unseren Versuchen keine Schlüsse ziehen. Untersuchungen von Mirsky sprechen dafür, daß D 860 als Fermentinhibitor in den Stoffwechsel der Zelle eingreift. In vitro-Versuche von Vaughan zeigten eine Hemmwirkung von D 860 auf die Glucose-6-Phosphatase. Inwieweit D 860 in hohen Konzentrationen durch Störung der Zellfermentreaktionen zu toxischen Symptomen führen kann, ist nicht bekannt. An Leberschnitten fanden Mohnike u. Knitsch bei D 860-Konzentrationen von 400 mg-% eine starke Beeinträchtigung der Zellatmung. Experimentelle Befunde, welche gestatten, die beschriebene neurotoxische Wirkung hoher Dosen von D 860 über eine spezifische Schädigung des Stoffwechsels der Nervenzelle zu deuten, liegen noch nicht vor.

Summary

The effects of the oral antidiabetic therapeutic N-(4-methyl-benzenesulfonyl)-N-butylurea (D 860, "Artosin", "Rastinon") on polysynaptic reflexes of the spinal cord and on the indirectly stimulated muscles of decerebrated, decapitized, and despinalized cats have been investigated. It was found that

1. Doses of 300—500 mg./kg. of D 860 paralyse the polysynaptic reflexes; with the method of the isolated perfused extremity it was shown that this paralysis is due to a direct action of D 860 on the spinal cord.

2. Higher doses (about 720 mg./kg.) of D 860 finally decrease the contractions of the indirectly stimulated muscle. The result of the direct muscle stimulation is unchanged.

3. The reflex depression was independent of the blood sugar level, which did not sink under critical values of 60 mg.-%.

4. After an extrem poisoning of D 860, animals finally died by a paralysis of the respiration and/or circulation centres in the medulla.

Literatur

Achelis, J. D., u. K. Hardebeck: Über eine neue blutzuckersenkende Substanz. Dtsch. med. Wschr. **1955**, 1452. — Becker, W. H., E. Buddecke u. H. Müller: Blutzuckerwirkung von Nadisan (BZ 55) beim pankreasresezierten Hund. Klin. Wschr. **1956**, 920. — Bernhard, C. G., and C. R. Skoglund: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, 435 (1953). — Bertram, E., E. Bendfeld u. H. Otto: Über ein wirksames perorales Antidiabeticum (BZ 55). Dtsch. med. Wschr. **1955**, 1455. — Bieter, R. N., A. B. Baker, I. G. Beaton, I. M. Shaffer, T. M. Serry and B. A. Orr: Nervous injury by sulfanilamide and some of derivates in the chicken. J. Amer. Med. Assoc. **116**, 2231 (1941). — Bülbring, E., S. H. Burn and C. R. Skoglund: J. of Physiol. **107**, 289 (1948). — Erdmann, W. D.: Versuche zur Deutung des sogenannten „Vulpian-Effektes" von Curarin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 272 (1956). — Evans, C. L.: Principles of human physiology. London 1949. — Franke, H., u. J. Fuchs: Ein neues antidiabetisches Prinzip.

Dtsch. med. Wschr. **1955**, 1449. — Hasselblatt, A., u. W. Bludau: Dosiswirkungsbeziehungen bei Dauerinfusionen des N-(4-methyl-benzolsulfonyl)-N-butyl-harnstoffs („Rastinon") am Blutzucker des Kaninchens. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — Hoffmann, G., u. E. Witte: Dauerinfusionsgerät mit Uhrwerkantrieb. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 221 (1950). — Houssay, B. A., and J. C. Penhos: Action of the hypoglycemic sulfonyl compounds in hypophysectomized, adrenalectomized, and depancreatized animals. Metabolism **5**, 727 (1956). — Koll, W.: Studien über den Antagonismus von Narkotica und Analeptica am Zentralnervensystem. Versuche mit Cardiazol und Strychnin am Rückenmark der Katze. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 365 (1937). — Lang, S., and S. Sherry: Some effects of orinase in the rat. Metabolism **5**, 733 (1956). — Miller, W. L., and W. E. Dulin: Orinase a new oral hypoglycemic compound. Science (Lancaster, Pa.) **123**, 584 (1956). — Mirsky, I. A.: The role of insulinase and insulinase inhibitor. Metabolism **5**, 138 (1956). — Mohnike, G., u. U. Hagemann: Die Wirkung verschiedener Dosen von N_1-sulfanilyl-N_2-n-butylcarbamid. Arzneimittelforsch. **6**, 389 (1956). — Mohnike, G., u. W. Knitsch: Über die Wirkung von D 860 an Leberschnitten. Dtsch. med. Wschr. **1956**, 891. — Scholz, J., u. A. Bänder: Über die orale Behandlung des Diabetes mellitus mit N-(4-methylbenzolsulfonyl)-N-butyl-harnstoff. Dtsch. med. Wschr. **1956**, 825. — Taugner, R., u. W. Culp: Über die Wirkungen von Nicotin auf das Rückenmark der Katze. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 423 (1953). — Vaughan, M.: In vitro studies on the action of sulfonamide hypoglycemic agents. Science (Lancaster, Pa.) **123**, 885 (1956). — Wymer, I.: Eine experimentelle Studie über Narkose zugleich ein Beitrag zur pathologischen Physiologie der Narkose. Dtsch. Z. chir. **195**, 353 (1926).

Dr. E. Gerstenberg, Pharmakolog. Institut der Universität Göttingen, Geiststr. 9

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 419—439 (1957)

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg)

Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die neuromuskuläre Erregungsübertragung* **

Von

Hans Günter Kraatz und Wolfgang Trautwein

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juni 1957)

An der motorischen Endplatte sind bei der Erregungsübertragung präsynaptische und postsynaptische Ereignisse zu unterscheiden. Präsynaptisch bietet sich das Problem, wie der ankommende Nervenimpuls zur Freisetzung einer ausreichenden Menge von Überträgerstoff führt; postsynaptisch steht die Frage der Überträgerstoff-Receptorreaktion sowie deren Folge, eine Permeabilitätsänderung der postsynaptischen Membran, im Vordergrund. Diese Permeabilitätsänderung führt zum Endplattenpotential (Epp), dessen Form und Amplitude also sowohl durch präsynaptische als durch postsynaptische Einflüsse bestimmt werden (siehe die ausführliche Darstellung von Del Castillo u. Katz 1956).

Neuere Ergebnisse haben gezeigt, daß an der Endplatte die Acetylcholinfreisetzung in diskreten Beträgen erfolgt; diese ACh-„Quanten" werden von „sekretorischen" Einheiten der Endplatte freigegeben. An der „ruhenden" Endplatte findet sich eine Daueraktivität, erkennbar an kleinen Miniaturendplattenpotentialen (Miniatur-Epp), die die Folge der spontanen Freisetzung solcher diskreter ACh-Beträge sind (Fatt u. Katz 1952). So gliedert sich präsynaptisch das Problem einerseits in die Frage nach der Bildung sowie Freisetzung der elementaren Überträgerstoff-„Quanten", zum anderen, wie der ankommende Nervenimpuls eine größere Zahl solcher sekretorischer Einheiten synchron aktivieren kann.

Es hat sich ergeben, daß die ACh-Menge solcher „Quanten", wie sie die einzelnen Einheiten bei spontaner oder durch Nervenimpulse veranlaßter Freisetzung abgeben, in den Grenzen der Meßbarkeit konstant ist. Änderungen der Amplitude des Epp durch präsynaptische Einflüsse kommen durch die Aktivierung einer unterschiedlichen Anzahl von Einheiten durch den Nervenimpuls zustande. So vermehrt z. B. Erhöhung

* Herrn Professor Dr. Fritz Hildebrandt zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Die Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung der Rockefeller Foundation und der Firma Hoffmann-La Roche.

der Calciumkonzentration die Zahl der antwortenden Einheiten; Vergrößerung der Magnesiumkonzentration reduziert sie bei genügender Konzentration bis auf die Antwort weniger oder einer einzelnen Einheit; diese Antwort ist dann ein Epp von der Größe eines spontan entstandenen Miniatur-Epp (del Castillo u. Katz 1954a u. b). Weitere Einflüsse, die das Epp über die Zahl der aktivierten Einheiten ändern, sind z. B. die Bahnung und die „Ermüdung" (del Castillo u. Katz 1954c). Die Antworten zweier gleich großer Reize zeigen bei kurzem Reizintervall eine unterschiedliche Amplitude: diejenige der zweiten Antwort ist größer als die der ersten (Schaefer u. Haass 1939, Eccles, Katz u. Kuffler 1941, Feng 1941 a u. b). Man spricht von Bahnung, die dadurch zustande kommt, daß der zweite Nervenreiz eine größere Zahl sekretorischer Einheiten rekrutiert. Der Abnahme der Amplitude des Epp im Verlaufe einer längeren Reizserie, der „Ermüdung", liegt ein Nachlassen der Rekrutierung zugrunde.

Bei der „Ermüdung" wie auch bei der Zunahme der Rekrutierung, die mit der Dehnung des Muskels zu erreichen ist (Hutter u. Trautwein 1956) dürften Stoffwechseleinflüsse entscheidend im Spiele sein. Ihre Kenntnis zu erweitern ist das Anliegen dieser Arbeit. Über die Ergebnisse wurde bereits kurz berichtet (Trautwein u. Kraatz 1957).

Methodik

Nerv-Muskel-Präparate des M. extensor digiti IV sowie des M. sartorius des Frosches (Rana esculenta) wurden verwendet. Das Präparat wurde unter Beibehaltung der in situ Länge horizontal zwischen 2 Zängchen in einer mit Ringer-Lösung gefüllten Plexiglasschale, welche auf einem heb- und senkbaren Tischchen lag, gehalten.

Je nach dem Versuchszweck wurden verschiedene Anordnungen getroffen. Zur extracellulären Ableitung von Epp wurde das curarisierte Präparat in eine Paraffinschicht gehoben, die über der Ringer-Lösung lag. Zur Ableitung der Epp wurden Platinelektroden verwendet; die eine davon konnte mittels eines Mikrometertriebes am Präparat entlang bewegt werden, eine zweite lag am pelvisnahen Muskelende. Diese Anordnung war notwendig, weil nach jedem Heben und Senken des Muskels in Ringer-Lösung der Endplattenfocus erneut bestimmt werden muß.

Zur intracellulären Ableitung der Spontantätigkeit (Miniatur-Epp) innerhalb eines Endplattenfocus einer Faser lag das Präparat während des ganzen Versuches in Ringer-Lösung, zur Erleichterung der Zellpunktion in der Endplattenregion durch eine Plexiglasbrücke unterstützt. Die gleiche Anordnung wurde getroffen bei intracellulärer Ableitung von Epp; dabei wurde der Nerv (etwa 5 cm lang präpariert) in eine kleine, unten geschlitzte Kammer gezogen, die in der Nähe des Muskels am Boden der Plexiglasschale fixiert war. Die Ringer-Lösung, die in dieser Kammer hochsteigt, wird mit Paraffin überschichtet, in dem das Nervenende auf den Reizelektroden gehalten wird. Auf diese Weise kann bei diesen Versuchen eine optisch oft störende Paraffinschicht über dem Muskel vermieden werden.

Bei den Polarisationsexperimenten ist die Ringer-Lösung insgesamt mit Paraffin überschichtet und der Muskel, selbst noch in Ringer-Lösung, an der Paraffin-Grenzfläche gehalten. Der Nerv wird so in das Paraffin gezogen, daß der dünne Nervenabschnitt kurz vor Eintritt in den Muskel durch die Öl-Ringer-Grenzfläche tritt. Im

Paraffin wird der Nerv mit einer Silber-Silberchlorid-Elektrode in Kontakt gebracht, die zweite Elektrode liegt im Ringer-Bad. Ein Gleichstrom über die beiden Elektroden tritt je nach der Polung an der Paraffin-Ringer-Grenzfläche ein oder aus und ändert dort das Ruhepotential der markhaltigen Nervenfasern, deren Entfernung zu den marklosen Nervenendigungen kurz ist. So können diese Endigungen, d. h. die präsynaptischen Strukturen, de- oder hyperpolarisiert werden. Das Prinzip der Anordnung kann aus der Abb. 1 der Arbeit von DEL CASTILLO u. KATZ (1954d) entnommen werden. Zu diesen Versuchen wurden bevorzugt solche Präparate verwendet, bei denen der Nerv unmittelbar nach Herantreten an den Muskel dünne Äste zu einigen Muskelfasern abgibt. Dann ist der Abstand von der Grenzfläche zu den Nervenendigungen besonders kurz, der zur Polarisation notwendige Strom liegt im Bereiche weniger μA, und die durch den Stromfluß verursachten Artefakte sind gering.

Zur intracellulären Ableitung wurden KCl-gefüllte Glasmikroelektroden, Spitzendurchmesser etwa 0,5 μ, von 10—50 MΩ Widerstand, verwendet. Zur Ableitung von Miniatur-Epp waren Elektroden über 20 MΩ ungeeignet, weil der Störpegel bei der notwendigen Verstärkung — die Amplitude der Potentiale beträgt etwa 0,5 mV — beträchtlich ist. Die Verstärkung der Potentiale erfolgte mit einer von TÖNNIES gebauten Kathodenfolger-Gleichstromverstärkeranordnung, die Darstellung am Cossoroscillographen. Gereizt wurde mit Rechtecktößen, meist eines oder zweier GRASS-Stimulatoren.

Die Zusammensetzung der Ringer-Lösung in mMol war folgende: Na^+ 112,8, K^+ 2,7, Ca^{++} 1,8, Cl^- 117,3, HCO_3^- 1,8. Wenn der Lösung Magnesiumchlorid beigefügt wurde, war die NaCl-Konzentration zur Wahrung eines konstanten osmotischen Druckes entsprechend verringert. Zur Ableitung der spontanen Miniatur-Epp wurde der Badelösung Prostigminbromid 1 in 10^6 zur Erhöhung der Amplitude zugesetzt. 2,4 α-Dinitrophenol wurde in die Badelösung gegeben, die verwendeten Konzentrationen des Giftes waren 0,1 und 0,2 mMol. Der p_H-Wert der Ringer-Lösung lag zwischen 6,8 und 7,2, die Raumtemperatur zwischen 19 und 22° C. Die Versuche wurden vom September 1956 bis April 1957 durchgeführt.

Ergebnisse

Das Epp bei Ermüdung und DNP-Vergiftung

Wird ein curarisierter M. sartorius jede halbe Sekunde indirekt gereizt, so nimmt die Größe der Reizantwort, die Amplitude des Endplattenpotentials (Epp), im Laufe der Reizserie ab. Bei der genannten Folge ist nach 200 Reizen die Amplitude auf etwa die Hälfte abgefallen (siehe Abb. 1 B). Nach einem Ringer-Bad von 5—10 min Dauer zeigt sich bei ruhendem Muskel diese neuromuskuläre „Ermüdung" als reversibel. Eine erneute Reizfolge in Paraffin beginnt mit Epp, deren Amplituden sich wieder erholt haben; sie nehmen jedoch im Verlauf dieser zweiten Reizfolge rascher ab als bei der ersten. Wird nun der ruhende Muskel nochmals in Ringer-Lösung gebadet, der aber DNP (0,2 mMol) zugesetzt ist, so bleibt die Erholung aus (siehe Abb. 1 C); im Verlauf einer erneuten Reizfolge nehmen die Amplituden rasch ab, nach 200 Reizen auf etwa $^1/_5$ des Ausgangswertes (siehe Abb. 1 D). Eine Erholung in einem Ringer-Bad, dem DNP zugesetzt ist, tritt nicht ein.

Weitere Information liefert eine Variation dieses Versuches, bei der das curarisierte Präparat jede halbe Sekunde mit einem Doppelreiz (Abstand der beiden Rechteckimpulse 10 msec) indirekt gereizt wird. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist aus der Abb. 2 zu entnehmen. Nach etwa 180 Reizen nehmen die beiden Antworten auf den Doppelreiz von 0,45 auf 0,35 mV bzw. von 0,6 mV auf 0,5 mV infolge der bekannten „Ermüdung" ab. Der Grad der Bahnung der zweiten Reizantwort durch die erste (siehe Einsatzfigur der Abb. 2) ist demnach bei der „Ermüdung" unverändert. Analog zu dem Ergebnis des Versuchs mit Einzelreiz ist auch hierbei die Erholung nach einem Ringer-Bad vollständig. Wird jedoch der Muskel 5—10 min lang in einer Ringer-Lösung, die DNP (0,2 mMol) enthält, gebadet, so tritt keine Erholung ein, und es nehmen im Verlauf einer weiteren Reizfolge die Amplituden der Antworten schnell ab. Erneutes Spülen des Muskels in der DNP-Ringer-Lösung führt zu keiner Erholung mehr, nach wenigen Reizen tritt Erschöpfung ein, die Epp nehmen rapid ab. Nun ist die zweite Antwort nicht mehr höher als die erste, die Bahnung also bei einem Doppelreiz nicht mehr erkennbar. Diese Wirkungen sind irreversibel, auch längeres Waschen des Muskels in Ringer-Lösung führt zu keiner Erholung von der Vergiftung.

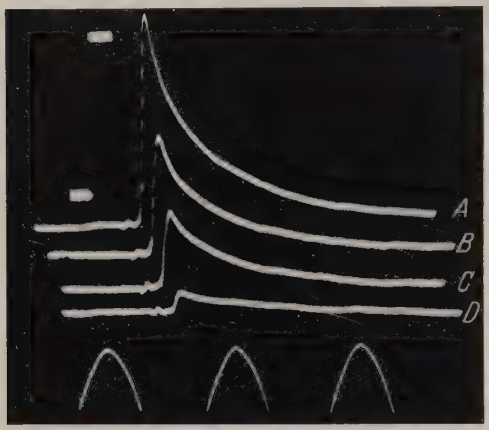


Abb. 1. In Paraffin abgeleitete Epp im Verlauf einer langdauernden Folge von Einzelreizen (2/sec). *A* 1. Epp unmittelbar nach Bad in Ringer-Lösung. *B* 200. Epp danach; Amplitudenabnahme durch Ermüdung. *C* 1. Epp unmittelbar nach Bad in Ringer-Lösung mit DNP 0,2 mMol von 10 min Dauer; keine Erholung. *D* 200. Epp danach. M. sartorius, $3 \cdot 10^{-6}$ Curare. Eichung 1 mV, 50 Hz. Aufstrich nachgezeichnet

Das Bild der DNP-Vergiftung entspricht demnach etwa dem einer forcierten „Ermüdung", im Falle der Vergiftung vielleicht besser mit irreversibler Erschöpfung bezeichnet. Die Analyse dieser Erschöpfung ging von folgenden Überlegungen aus: Wie eingangs erwähnt, erfolgt die Freisetzung des Überträgerstoffs in diskreten „Sekrettröpfchen", deren ACh-Gehalt unter den verschiedensten Einflüssen von erstaunlicher Konstanz ist. Die Zahl der durch ein Nervenaktionspotential aktivierten „Tröpfchen"-liefernden Einheiten vermehrt sich bei kurz aufeinanderfolgender Aktivität im Sinne einer Rekrutierung: Bahnung; sie nimmt ab im Verlauf einer längeren Reizserie: „Ermüdung". Bei der

Ähnlichkeit der DNP-Vergiftung mit der „Ermüdung" war auch hierbei an ein solches Versagen der Rekrutierung zu denken. Daneben könnte man annehmen, daß ein Gift, das die Bildung energiereicher Phosphate unterbindet, bei fortgeschrittener Wirkung zu verringertem ACh-Gehalt der „Tröpfchen" führe, wodurch ebenfalls die Amplitude des Epp reduziert würde.

Ca- und Mg-Konzentration bei der DNP-Vergiftung

Neben Bahnung und „Ermüdung" beeinflussen Ca und Mg die Rekrutierung. Je höher die Mg-Konzentration der Badelösung des Muskels, desto weniger ACh-freisetzende Einheiten kann das ankommende Aktionspotential des Nerven an den Endigungen aktivieren, desto niedriger also das Epp (DEL CASTILLO u. KATZ 1954b). Ca-Ionen wirken antagonistisch zu denen des Mg, sie erhöhen die ACh-Freisetzung der aktivierten Endplatte.

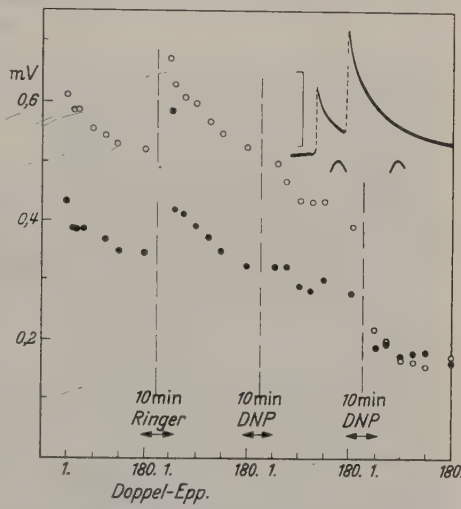


Abb. 2. Epp auf wiederholte Doppelreize (siehe Einsatzfigur; 2/sec mit 10 msec Intervall). Abszisse: Anzahl der Doppelreize. Ordinate: Amplitude der Epp in mV. Nach erster Reizfolge 10 min Bad in Ringer-Lösung, nach zweiter und dritter Reizfolge je 10 min Bad in Ringer-Lösung mit DNP 0,2 mMol. • Antwort auf 1. Impuls, o Antwort auf zweiten Impuls des Doppelreizes. M. sartorius, $1{,}5 \cdot 10^{-6}$ Curare. Eichung 1 mV, 50 Hz

Die Erschöpfung nach DNP wie auch die „Ermüdung" treten nun nur im Verlaufe einer länger dauernden Reizserie auf, d. h. wenn zuvor eine große Menge ACh freigesetzt wurde: Die Amplitude des Epp nimmt ab, da ein Nervenaktionspotential weniger Überträgerstoff freisetzen kann. Es ist bekannt, daß Ermüdung bei hoher Mg-Konzentration kaum noch eintritt, bei hoher Ca-Konzentration dagegen verstärkt wird (DEL CASTILLO u. KATZ 1954b). Deutlich ist bei 1,8 mMol Ca (Abb. $3A_1$ und 4A) die Phase der Bahnung unmittelbar nach dem Einsetzen der Reizserie von der anschließenden „Ermüdung" zu unterscheiden. Dagegen läßt das Präparat unter hoher Mg-Konzentration (Abb. $3B_1$) nur die Bahnung erkennen, hier fehlt die „Ermüdung" im dargestellten Abschnitt dieses Versuchs.

Wird jetzt der Badflüssigkeit DNP (0,2 mMol) zugegeben, so tritt nach wenigen Reizserien eine irreversible Erschöpfung ein, am raschesten bei erhöhter Ca-Konzentration (5,4 mMol) innerhalb der ersten kurzen Salve der Abb. 4C. Bei 1,2 mMol Ca entwickelt sich diese Erschöpfung langsamer, bei der Abb. $3A_2$ handelt es sich um den Beginn der zweiten

Reizserie. Die Dauer einer solchen Salve betrug jeweils 2 sec, das Intervall zwischen zweien 2 min. Abb. $3B_2$ zeigt die Antworten einer Reizserie eines mit Magnesium vorbehandelten Muskels, auch hierbei tritt die Erschöpfung nach DNP-Gabe ein, allerdings deutlich später; bei der Abb. $3B_2$ handelt es sich um die Antwort der 8. Reizserie. Zu Beginn dieser Salve fallen die Antworten vollständig aus und werden in ihrem weiteren Verlauf gebahnt. Die Bahnung scheint demnach von der DNP-Vergiftung wenig betroffen (siehe auch Abb. $3A_2$) und ihr Angriffspunkt auf dem Wege des Nervenaktionspotentials zur ACh-Freisetzung vor dem

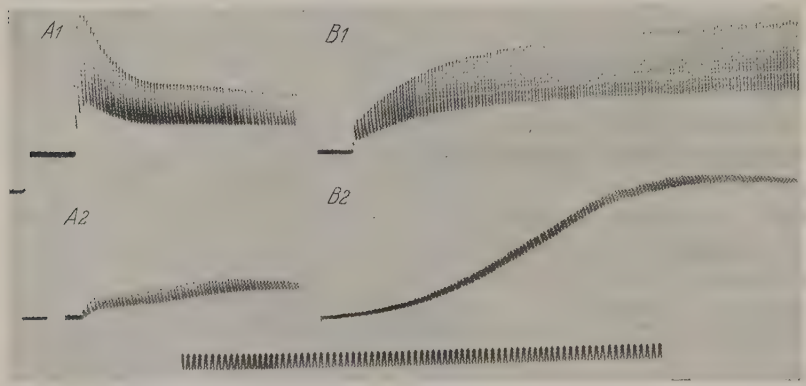


Abb. 3. Darstellung des DNP Vergiftungsbildes in Abhängigkeit von der Ca- und Mg-Konzentration Epp des M. sartorius auf Reizserien (Reizabstand 10 msec). A_1 nach 10 min in Ringer-Lösung mit Curare $3 \cdot 10^{-6}$. A_2 2. Serie nach 10 min in dieser Lösung mit DNP 0,2 mMol. B_1 neues Präparat, nach 10 min Mg 10 mMol, Ca 1,2 mMol. B_2 8. Serie nach 10 min in dieser Lösung mit DNP 0,2 mMol. Eichung 1 mV, 50 Hz

der Vergiftung zu liegen. Auf den gleichen Angriffspunkt der Bahnung ließ auch ihr Verhalten bei der „Ermüdung" schließen (del Castillo u. Katz 1954c).

Die Abhängigkeit der Entwicklung der DNP-Vergiftung von der Ca- und Mg-Konzentration zeigt, daß der wesentliche Angriffspunkt der Vergiftung präsynaptisch liegt. Deshalb wurde zu ihrer weiteren Aufklärung die Spontantätigkeit der Nervenendigungen untersucht, sowie die Reizantworten, die durch Mg auf die Amplituden der spontanen Miniatur-Epp fraktioniert waren.

Miniaturendplattenpotentiale (Miniatur-Epp)

Fatt u. Katz (1952) haben gezeigt, daß in der Endplattenregion einer Skeletmuskelfaser eine dauernde Spontantätigkeit herrscht: man findet niedrige Potentiale von etwa 0,5 mV Amplitude, die in zufälliger Folge auftreten und in ihrer Form dem Epp sehr ähnlich sind; sie werden deshalb als Miniatur-Epp bezeichnet und sind die postsynaptische Wirkung einer spontanen Freisetzung von ACh, die in Quanten

(„Tröpfchen" konstanten ACh-Gehaltes) erfolgt (DEL CASTILLO u. KATZ 1954b).

Den Einfluß von DNP auf diese Spontantätigkeit des m. extensor digiti IV gibt die Abb. 5 wieder, die Gesamtheit der Resultate ist in der Tab. 1 zusammengestellt. Bei fast allen Registrierungen nahm 1—3 min nach DNP-Gabe in die Badelösung die Frequenz der Miniatur-Epp zu (siehe Abb. 5B). Nach 10 min ist die Frequenz oft so hoch, daß das Zählen der Potentiale auch bei schnellerer Zeitschreibung nicht mehr möglich ist (siehe Abb. 5C). In 3 Fällen wurde beobachtet, daß ein so feuernder Focus sich nach einer Stunde allmählich wieder „beruhigte". Nach 2—3 Std stellt dann der immer seltener feuernde Focus seine Tätigkeit ein, das Ruhepotential der Muskelfaser beträgt dann nur noch 30—35 mV. Diese Frequenzzunahme der Miniatur-Epp nach DNP wurde auch bei verschiedenen Ca- und Mg-Konzentrationen registriert (siehe Tab. 1).

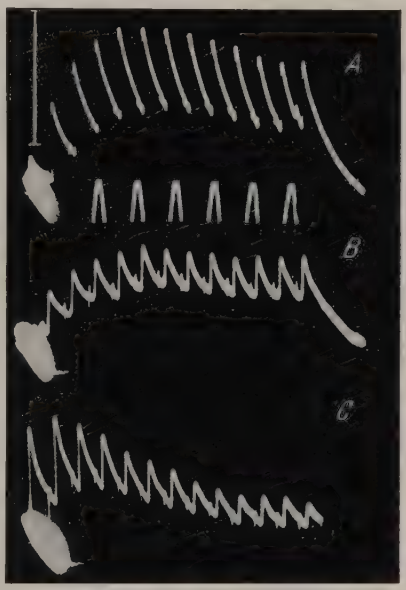


Abb. 4. Wie Abb. 3 (Serien von 13 Reizen, Reizabstand 15 msec). *A* nach 10 min in Ringer-Lösung. *B* nach 10 min in DNP 0,2 mMol. *C* nach 4 min in der Giftlösung plus Ca 5,4 mMol. Curare $2{,}5 \cdot 10^{-6}$. Eichung 1 mV, 50 Hz. Beachte die schnelle Erschöpfung der Reizantworten bei hoher Ca-Konzentration

Die Amplituden der Miniatur-Epp wurden von 3 Experimenten ausgewertet, deren Registrierungen ein Verhältnis der Miniatur-Epp zum Rauschpegel von 5 und größer aufwiesen. Aus Diagrammen der Verteilung der Häufigkeit der Amplituden vor und nach unterschiedlich langer Vergiftung konnten keine statistisch gesicherten Unterschiede ermittelt werden. Selbst aus Registrierungen der letzten Stadien der Vergiftung war wider Erwarten nicht auf eine Abnahme der Amplituden der Miniatur-Epp zu schließen. Auch vor dem Sistieren der Spontantätigkeit liefern die noch tätigen sekretorischen Einheiten ein unverändert hohes Miniatur-Epp.

In der Mehrzahl dieser Experimente wurde an einem zweiten Strahl des Oscillographen der Verlauf des Ruhepotentials der punktierten Muskelfaser verfolgt. Es nimmt in den ersten 10 min der Vergiftung, wenn überhaupt, nur gering — bis zu 5 mV — ab und hält sich dann etwa bis zu einer halben Stunde auf einem Niveau zwischen 75 und 85 mV. Dann fällt es weiter und erreicht nach 1½—2 Std Werte

Tabelle 1. *Frequenz der Miniatur-Epp · sec⁻¹* vor und zu verschiedenen Zeiten nach DNP. a = Beobachtungsdauer in sec; b = Miniatur-Epp · sec⁻¹

Versuch vom	vorher		1 min		3 min		5 min		10 min		mMol-Konzentr.	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	Mg	Ca
29. 9. 56	23	2,6	23	2,4	21	26,1	9	34,9	—	—	7,0	0,6
2. 10. 56	20	0,4	17	0,6	51	1,1	—	—	—	—	7,0	0,6
3. 10. 56*	56	0,8	35	0,9	—	—	—	—	—	—	7,0	0,6
3. 10. 56**	32	1,2	33	3,6	33	4,0	—	—	—	—	7,0	0,6
14. 2. 57	174	0,7	—	—	74	4,9	—	—	—	—	10,0	0,6
21. 2. 57	45	1,0	—	—	30	22,2	—	—	—	—	10,0	0,8
25. 2. 57	33	3,0	13	2,5	38	2,8	—	—	—	—	8,5	0,6
26. 2. 57	54	2,2	—	—	54	25,8	—	—	—	—	15,0	6,0
27. 2. 57	54	0,4	6	2,3	11	4,2	35	13,2	—	—	9,0	0,6
8. 2. 57	63	3,3	25	1,6	24	2,6	25	8,0	—	—	9,0	0,6
2. 3. 57	31	2,8	28	2,5	58	1,2	32	1,2	17	3,5	8,0	0,6
7. 3. 57	73	0,5	—	—	77	0,8	13	1,9	19	2,9	8,0	0,6
8. 3. 57	52	1,7	—	—	67	1,6	66	2,0	35	2,5	7,0	0,6
28. 3. 57	60	0,9	—	—	55	7,6	30	6,5	39	6,3	7,0	0,6
27. 3. 57	74	0,3	28	0,1	36	6,4	5	10,0	—	—	8,0	0,6

* DNP 0,1 mMol. ** DNP 0,3 mMol, sonst immer 0,2 mMol. In allen Versuchen Prostigmin $1 \cdot 10^{-6}$

im Bereiche von 30 mV; ein ähnliches Verhalten wurde unter 2,4 Dinitronaphthol von Loewenstein u. Szent Györgyi (1955) am M. sartorius beschrieben.

In weiteren Versuchen wurde neben der Spontantätigkeit zugleich auch das Epp als Reizantwort gemessen. Hierzu wurde die Mg-Konzentration erhöht, um die Zahl der antwortenden Einheiten und damit das Epp niedrig zu halten. Bei 7 mMol Mg und 0,6 mMol Ca (siehe Abb. 6A) ist z. B. das Epp dieses Focus soweit reduziert, daß auf Nervenreiz nur noch wenige sekretorische Einheiten ansprechen, erkennbar an einem Epp, dessen Amplitude in der Größenordnung der spontanen Miniatur-Epp liegt. Bei solcher Mg-Konzentration ist der Aufbau des Epp aus Einheiten der Größe der Miniatur-Epp gut demonstrierbar: ein Nervenreiz führt entweder zu keiner Antwort mehr oder zu einer von der Größe eines oder eines Vielfachen eines Miniatur-Epp, siehe Abb. 6A (s. del Castillo u. Katz 1954b).

Wird nun das Präparat mit DNP vergiftet, so tritt zuerst, noch bevor die Frequenz der spontanen Miniatur-Epp zunimmt, eine weitere Abnahme der Reizantwort ein. Diese nimmt, wenn sie vorher ein Vielfaches betrug, auf die Größe weniger oder einer Einheit (= der Amplitude der Miniatur-Epp) ab. Nach 2 min Vergiftungszeit tritt bei sekündlicher Reizung nur noch vereinzelt eine Antwort ein, schließlich bleibt

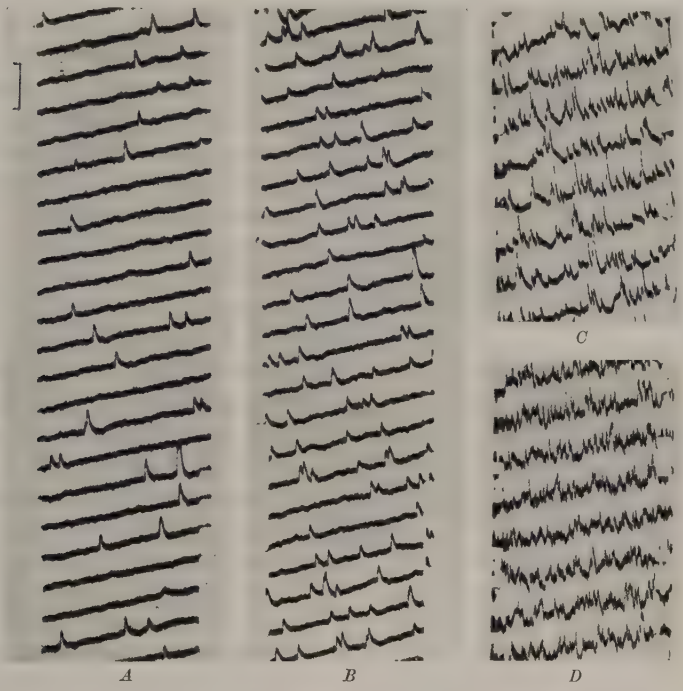


Abb. 5. Intracellulär abgeleitete spontane Miniatur-Epp des M. ext. longus dig. IV. Prostigmin $1 \cdot 10^{-6}$. *A* in Ringer-Lösung. *B* 3 min nach Zugabe von DNP 0,2 mMol., *C* 10 min, *D* 13 min danach. Eichung 0,5 mV, Dauer eines Strahldurchlaufs 500 msec. Die einzelnen Zeilen der Abbildung stellen eine fortlaufende Registrierung dar, die direkte Fortsetzung des rechten oberen Randes einer Zeile ist der linke Rand der darunterliegenden Zeile

sie ganz aus (siehe Abb. 6B und Tab. 2). Unterdessen hat die Spontantätigkeit bereits deutlich zugenommen. Ein ähnlicher Versuch bei niedrigerer Mg-Konzentration und deshalb größerer Reizantwort vor der Vergiftung ist nochmals in der Abb. 7 wiedergegeben. Sie zeigt, wie nach DNP die Antworten in ihrer Amplitude abnehmen und schließlich ganz ausbleiben, während die Frequenz der Spontantätigkeit zunimmt.

Die Abnahme der Epp bei der DNP-Vergiftung hat demnach ihre Ursache darin, daß die Zahl der sekretorischen Einheiten, die ein Nervenaktionspotential aktiviert, kleiner und schließlich zu Null wird, ein Schluß, den das Verhalten des vom ganzen DNP-vergifteten Muskels

unter verschiedenen Ca- und Mg-Konzentrationen abgeleiteten Epp bereits wahrscheinlich gemacht hat (siehe Ende des letzten Abbschnitts S. 424).

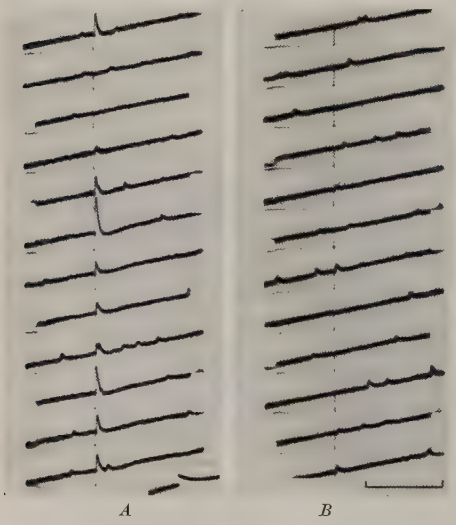


Abb. 6. Epp als Reizantwort sowie spontane Miniatur-Epp des M. ext. lg. dig. IV. Mg 7 mMol, Ca 0,6 mMol, Prostigmin $1 \cdot 10^{-6}$. *A* in Ringer-Lösung. *B* 4 min nach Zugabe von DNP 0,2 mMol. Eichung 1 mV, 200 msec. Bei jedem Durchlauf ein Reiz an gleicher Stelle (siehe Artefakte). Beachte den Unterschied in der Häufigkeit der Reizantworten zwischen *A* und *B*. Weitere Erklärung siehe Text

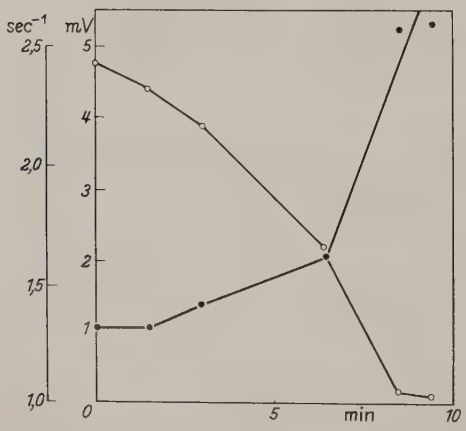


Abb. 7. Beziehung der Frequenz der spontanen Miniatur-Epp (li. Ordinate) bzw. der Amplitude der Epp (re. Ordinate) zu der zeitlichen Wirkung des DNP. ○ Amplituden der Epp. • Frequenz der Miniatur-Epp. Mg 7 mMol, Ca 0,6 mMol, Prostigmin $1 \cdot 10^{-6}$. M. ext. lg. dig. IV

Wie oben (siehe S. 424) schon gezeigt, funktioniert der Bahnungsmechanismus bei der DNP-Vergiftung noch, wenn ein Einzelreiz keine Antwort mehr auslöst. Dieser Versuch, dort am ganzen Muskel durchgeführt, wurde hier an der Endplatte der DNP-vergifteten Faser wiederholt (siehe Abb. 8 A). Die Antwort auf einen Einzelreiz ist bereits ausgefallen (Beginn, unterer Rand 8 A). Nun wird der Nerv mit einer Impulsserie (Intervall zwischen den Rechteckimpulsen 10 msec) gereizt; dabei treten unmittelbar nach Beginn der Reize erneut wieder Antworten auf, die im weiteren Verlaufe an Amplitude zunehmen. Nach einer solchen Reizserie ist die Frequenz der spontanen Miniatur-Epp oft stark erhöht (siehe Abb. 8 B), nimmt dann wieder ab, bleibt jedoch höher als sie vor der Reizserie war. Auch die bei der Vergiftung des Muskels bereits erloschene Antwort auf Einzelreize nimmt nach Ende der Reizserie wieder an Häufigkeit zu (siehe Abb. 8 A). Werden solche Reizsalven im weiteren Verlaufe der Vergiftung mehrmals wiederholt, so wird die Latenz vom Beginn der Salve bis zum sichtbaren Effekt der Bahnung, zum Erscheinen einer Antwort, immer länger;

schließlich bleiben die Antworten auch bei hochfrequenten längeren Salven aus.

Der weitere experimentelle Fortgang war durch eine Annahme über den wichtigsten Angriffspunkt und Mechanismus der DNP-Vergiftung bestimmt. Als mögliche Ursache der präsynaptischen Störung wurde eine Depolarisation der Nervenendigungen erwogen, das Für und Wider dieser Annahme wird unten diskutiert. Depolarisation der Nervenendigungen durch DNP könnte im vorliegenden Falle die Frequenzzunahme der Miniatur-Epp, das Versagen der Invasion des Nervenaktionspotentials in die Peripherie (Ausfall der Aktivierung sekretorischer Einheiten) sowie deren zeitweise Wiederherstellung durch Bahnung erklären. Es war deshalb naheliegend zu versuchen, die beschriebenen Wirkungen der DNP-Vergiftung durch Polarisation mittels angelegten Stromes wenigstens teilweise wieder aufzuheben.

Der Effekt von An- und Katelektrotonus der Nervenendigungen auf die DNP-Vergiftung

In diesem Abschnitt wird der Einfluß präsynaptischer Polarisation auf die Miniatur-Epp und die Reizantworten des DNP-vergifteten Muskels beschrieben. Zur richtigen Beurteilung der Ergebnisse sei vorweg erwähnt, daß präsynaptische elektrotonische Potentiale nicht über die Synapse auf die postsynaptische Membran ausgreifen (Kuffler 1949), die beschriebenen Effekte also nicht die Folge einer Hyper- oder Depolarisation der punktierten Muskelfaser sind,

Tabelle 2. *Häufigkeit der Antwort auf Einzelreize bei hoher Mg-Konzentration vor und zu verschiedenen Zeiten nach DNP-Gabe*
a = Zahl der gesetzten Reize. b = Antworten auf gesetzte Reize in Prozent (100% = 100 Reize führen zu 100 Epp)

Versuch vom	vorher		1 min		3 min		5 min		10 min		mMol-Konzentr.	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	Mg	Ca
14. 2. 57	242	46	—	—	31	23	—	—	—	—	10	0,6
25. 2. 57	88	75	26	54	77	13	66	6	—	—	8,5	0,6
27. 2. 57	108	36	12	—	22	5	100	8	—	—	9	0,6
1. 3. 57	57	75	23	70	28	61	34	21	—	—	9	0,6
2. 3. 57	63	98	56	100	115	85	64	56	33	9	8	0,6
7. 3. 57	145	100	—	—	154	79	—	—	—	—	8	0,6
8. 3. 57	105	100	—	—	134	100	132	100	70	69	7	0,6
27. 3. 57	148	46	56	38	72	29	10	—	—	—	8	0,6

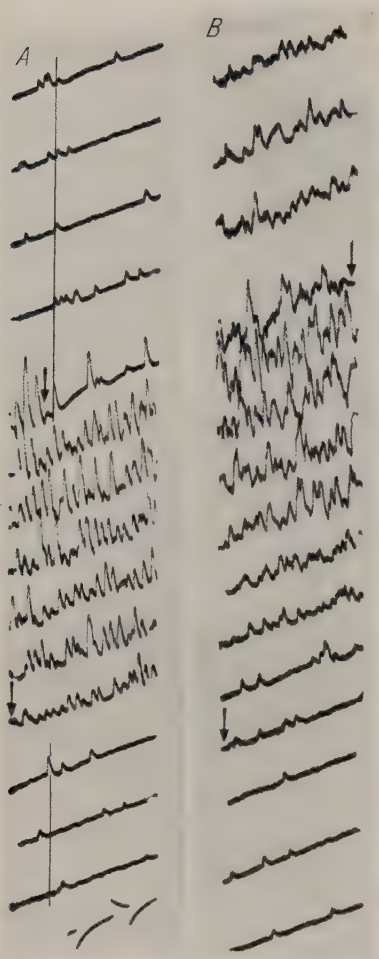


Abb. 8. Posttetanische Potenzierung beim DNP-vergifteten M. ext. lg. dig. IV. Miniatur-Epp und Antworten auf einzelne und repetitive Nervenimpulse. Dauer der Reizserien von Pfeil zu Pfeil, Reizabstand 10 msec. In A ist eine vertikale Linie durch den Artefakt der Einzelreize gezogen. Die Abbildung ist von unten nach oben zu lesen, beginnt also am linken Rand der untersten Zeile. Fortsetzung am rechten Rand der untersten Zeile ist der linke Rand der zweituntersten Zeile. *A* 6 min nach Zugabe von DNP 0,2 mMol. *B* 7 min danach. Mg 8 mMol, Ca 0,6 mMol, Prostigmin $1 \cdot 10^{-6}$. Eichung 0,5 mV, 500 msec Strahldurchgang. Beachte das Funktionieren der Bahnung bei vergiftetem Präparat, die Zunahme der Miniatur-Frequenz und das Wiedererscheinen der Antwort auf Einzelreize nach Sistieren der Reizserie

vielmehr der Ausdruck der Änderung des Ruhepotentials der Nervenendigungen.

1. Spontane Miniatur-Epp. Nach del Castillo u. Katz (1954d) führt während der Zeit des Stromflusses Katelektrotonus gestufter Intensität zu einer gradweisen Zunahme der Frequenz der Miniatur-Epp ohne Änderung ihrer Amplitude. Der Effekt ist stark unterdrückt bei hoher Mg-Konzentration. Anelektrotonus führt ebenfalls zu einer Zunahme der Miniaturfrequenz, der Entladungstyp ist jedoch anders: von einer bestimmten Stromstärke an, unter der meist jede Wirkung fehlt, tritt plötzlich ein massiver Ausbruch der Miniatur-Epp ein, der längere Zeit nach Unterbrechung des Stromflusses anhält (Abb. 11 A). Diese Wirkungen kathodischer und anodischer Polarisation bestätigen unsere Befunde 6 geglückter Experimente.

Kathodische Polarisation steigender Intensität führte zu gradweiser Zunahme der Frequenz der Miniatur-Epp. In der Abb. 9 ist die prozentuale Zunahme der Miniaturfrequenz bei steigendem Strom aufgetragen (100% = Frequenz der Miniatur-Epp in der zwischen jeder Stromerhöhung liegenden 10 sec dauernden stromlosen Pause). Zu bemerken ist, daß bei unseren Versuchen die Mg-Konzentration zwischen 4 und 7 mMol (Ca-Konzentration 0,6—1,8 mMol) gehalten wurde, und bei diesen Mg-Konzentrationen die Frequenz der Miniatur-Epp bei kathodischem Strom immer anstieg. Die absolute Zunahme bei einer

bestimmten Stromstärke war von Versuch zu Versuch verschieden. Dies ist zu erwarten, denn das Ausmaß des Katelektrotonus der Endigungen bei einer bestimmten Stromstärke hängt entscheidend von Imponderabilien ab, wie z. B. dem Abstand der Ringer-Ölgrenzfläche zu den Endigungen, der Dicke des Nerven usw. 3 min nach DNP-Gabe ist die Charakteristik der Abb. 9 nicht nennenswert geändert, die absolute Zahl der Miniatur-Epp hatte freilich bereits zugenommen. 10 min nach DNP war die Frequenz stark erhöht (bei fehlendem Stromfluß betrug sie jetzt 3/sec, vor DNP 0,5/sec) und bei kathodischem Strom nimmt sie weiter zu. Über 2,3 μA ist die Zunahme so beträchtlich, daß das Zählen der Potentiale auf dem Film nicht mehr möglich ist, weil zu viele superponieren und nicht mehr voneinander zu trennen sind. Ausschnitte aus dem der Abb. 9 zugrunde liegenden Versuch zeigt die Abb. 10. A gibt einen Eindruck von der Spontanfrequenz vor DNP-Gabe. B zeigt den Stromeffekt (2,3 μA), der in Abb. 9 mit dem Zeichen ○ markiert ist, 10 min nach DNP-Gabe. C gibt schließlich den nicht mehr auszuzählenden Effekt einer noch größeren Stromstärke. Gegenüber dem Verhalten vor DNP (siehe Abb. 10A) ist das Neue an Abb. 10B und C das Überdauern des Stromeffektes. Bei vergiftetem Präparat hält nach Öffnen des Stromkreises die Erhöhung der Frequenz der Miniatur-Epp an, um so länger, je stärker der fließende Strom war. Man gewinnt den Eindruck, daß die Effekte kathodischer Polarisation und der DNP-Wirkung sich hinsichtlich der Zunahme der Frequenz der Miniatur-Epp addierten.

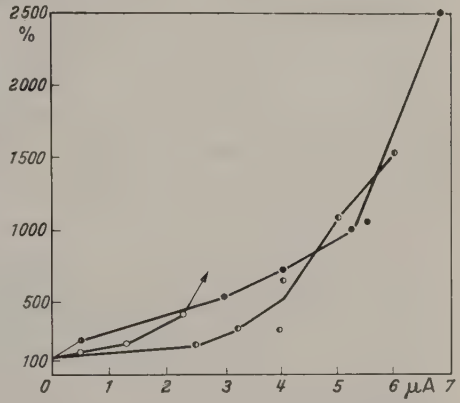


Abb. 9. Frequenz der spontanen Miniatur-Epp in Abhängigkeit von der Größe kathodischer Polarisation der Nervenendigungen. Abszisse: Stärke des kathodischen Stromes in μA. Ordinate: Frequenzzunahme der Miniatur-Epp in Prozent (100% = Frequenz der Miniatur-Epp in der zwischen jeder Stromerhöhung liegenden 10 sec dauernden stromlosen Pause. Mg 7 mMol, Ca 1,8 mMol, Prostigmin $1 \cdot 10^{-6}$. • vor Zugabe von DNP, ◐ 3 min, ○ 10 min nach Zugabe. M. ext. lg. dig. IV

Bei längerer Vergiftungszeit (20—30 min nach DNP) müssen immer größere Ströme angelegt werden, um die kathodische Zunahme der Miniaturfrequenz zu erhalten. Bei einer Stromstärke, die etwa dem 5fachen der höchsten im Diagramm der Abb. 9 verwendeten Intensität entspricht, wird dann noch eine geringe Frequenzzunahme beobachtet; überraschend nehmen nun bei solcher Stärke die Amplituden der Miniatur-Epp zu (siehe Abb. 10D). Zur Kritik dieses Befundes siehe Ende des nächsten Abschnittes.

Anodische Polarisation bestimmter Stärke führt auch nach DNP-Gabe zu einem „burst" von Miniatur-Epp, der sich nach einigen Sekunden wieder beruhigt (Abb. 11 A). Der zum Erreichen dieser „burst"-Schwelle notwendige Strom nimmt im Verlaufe der Vergiftung fortlaufend zu.

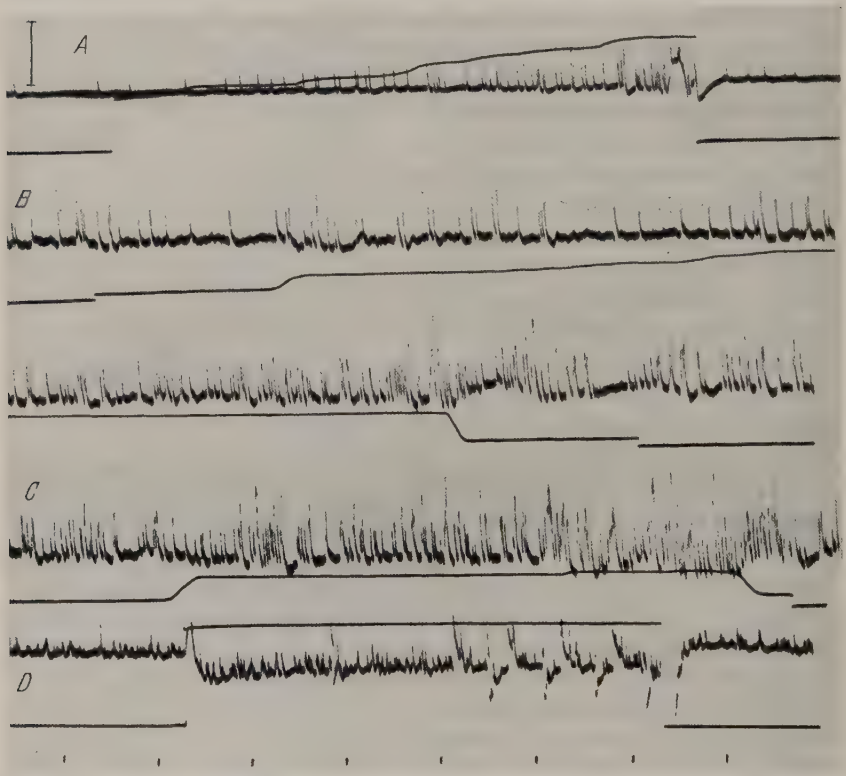


Abb. 10. Originaloscillogramme, die die Zunahme der Frequenz der Miniatur-Epp bei kathodischer Polarisation der Nervenendigungen zeigen. Der zweite Strahl mißt den kathodischen Polarisationsstrom (bei Stromschluß Ausschlag nach oben) als Spannungsabfall über einen bekannten Widerstand. *A* vor Zugabe von DNP. *B* (2. und 3. Stelle) 10 min nach Zugabe von DNP (0,2 mMol). *C* danach, mit etwas höherem Polarisationsstrom. *D* Amplitudenvergrößerung der Miniatur-Epp bei noch stärkerer kathodischer Polarisation, 39 min nach Zugabe von DNP. Während der Registrierung von *D* wurden Eichzacken von 1 mV gegeben. Empfindlichkeit des Strom-messenden Kanals in *D* 2mal geringer als *A*—*C*. Ordinateneichung in *A* für *A*—*C* 0,5 mV; Zeitmarken für *A*—*C* 1 sec, für *D* 0,5 sec. Mg 7 mMol, Ca 1,8 mMol, Prostigmin $1 \cdot 10^{-6} \cdot$ M. ext. lg. dig. IV

Abb. 11 B zeigt den fehlenden Effekt einer 3 mal größeren Stromstärke als in A, 5 min nach der Registrierung der Abb. 11 A bei gleicher Zellpunktion. Weitere Steigerung der Stromstärke löst das „burst"-Phänomen wieder aus, siehe Abb. 11 B. Im Anfangsstadium der Vergiftung, in dem die Frequenz der Miniatur-Epp bereits erhöht war, haben wir bei sehr vorsichtigem Suchen der „burst"-Schwelle, d. h. langsamem Aufdrehen des

stromregelnden Potentiometers, Registrierungen wie Abb. 11C erhalten: Kurz vor Erreichen der „burst"-Schwelle scheint es einen engen Strombereich zu geben, bei welchem die Amplituden und die Frequenz der Miniatur-Epp reduziert sind. Der Effekt wurde bei oscillographischer Beobachtung meist übersehen und war deshalb nur von kurzer Dauer, weil die Schwelle für das „burst"-Phänomen in unmittelbarer Nähe liegt.

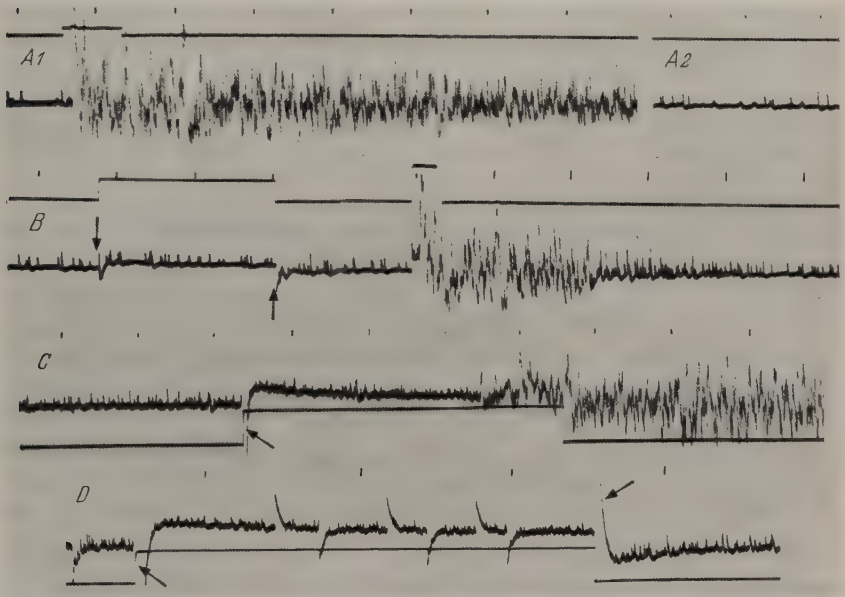


Abb. 11. Spontantätigkeit bei anodischer Polarisation. 2. Strahl anodischer Polarisationsstrom (Ausschlag nach oben). *A* Vor Zugabe von DNP. A_1 Auslösung eines „burst", der lange anhält. A_2 nach 23 sec ist Beruhigung eingetreten. *B* 5 min nach Zugabe von DNP (0,2 mMol). „Burst"-Phänomen mit erhöhtem Polarisationsstrom nicht auszulösen, es tritt erst bei noch größerer Stromstärke wieder auf. *C* 23 min nach DNP. Kurz vor Einsetzen des „bursts" sind Frequenz und Amplitude der Miniatur-Epp reduziert. *D* Amplitudenverkleinerung der Miniatur-Epp bei hoher anodischer Polarisation (Empfindlichkeit des Strom-messenden Kanals gegenüber *A*—*C* um den Faktor 3 verringert). Die Pfeile in *B*, *C* und *D* markieren Reizeinbrüche. M. ext. lg. dig. IV. Mg 4,5 mMol, Ca 0,6 mMol, Prostigmin $1 \cdot 10^{-6}$. In *D* sind der Registrierung Eichzacken von 1 mV aufgesetzt (Ausschläge nach oben und unten); sie gelten von *A*—*D*. Zeitmarken in *A*—*D* 1 sec

Nach etwa 20—30 min Vergiftungszeit ist auch mit hoher anodischer Stromstärke kein Ausbruch von Miniatur-Epp mehr auszulösen. Bei etwa 5facher Stromstärke der „burst"-Schwelle vor DNP tritt nun eine Abnahme der Amplituden und wahrscheinlich der Frequenz der Miniatur-Epp ein; letzteres ist wegen der Amplitudenabnahme nicht eindeutig zu entscheiden (siehe Abb. 11D).

Dieser Effekt, auf die Zeit des Stromflusses beschränkt und in 3 Versuchen mehrmals nacheinander beobachtet, wurde zunächst als Artefakt betrachtet, das gleiche gilt für die oben erwähnte Amplitudenzunahme bei großen kathodischen Strömen. Bei der gewählten

Versuchsanordnung führen Ströme solcher Stärke unter Umständen zu Kontrakturen der Muskelfasern in der Nähe des Durchtritts des Nerven durch die Ringer-Ölgrenzfläche (siehe die Kritik der Bewegungsartefakte bei del Castillo u. Katz 1954d). Es wäre auch denkbar, daß die Amplitude der Miniatur-Epp durch plötzliche Kaliberschwankungen des „Muskelkabels" beeinflußt würden. Der Effekt wurde aber auch registriert

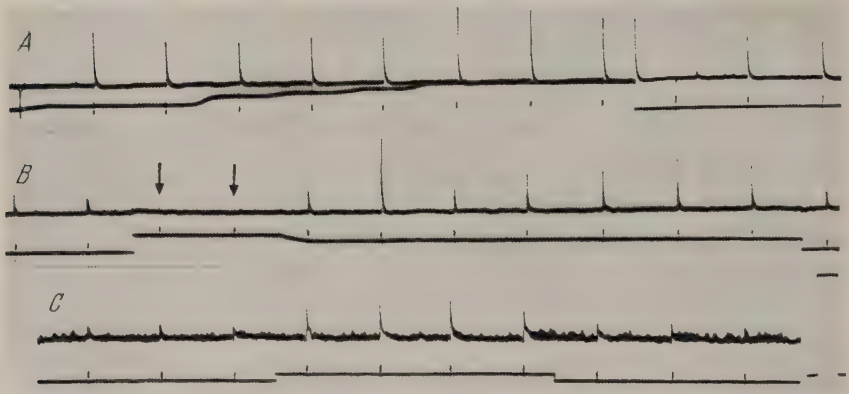


Abb. 12. Darstellung der Wirkung geringer anodischer Polarisation der Nervenendigungen auf die Antwort sekündlicher Nervenreizung. *A* vor, *B* 2 min nach Zugabe von DNP 0,2 mMol. *C* Bei nahezu eingetretenem Block, 5 min später. Empfindlichkeit des strommessenden Kanals in *A* 1,5 mal größer als in *D* und *C*. In *B* führt anodische Polarisation anfänglich zu Leitungsblock, siehe Pfeile. Mg 7 mMol, Ca 1,8 mMol. Intracelluläre Ableitung am ext. lg. dig. IV. Reizmarkierung im Abstand von 1 sec, Eichung 5 mV

ohne sichtbare Bewegung der Muskelfasern bei gleichzeitiger Beobachtung mit 60facher Vergrößerung. Weiter macht sich während des Stromflusses solcher Stärke eine erhebliche Störgleichspannung zwischen Ableiteelektrode und Erde bemerkbar, so daß das Arbeiten mit Zeitkonstante erforderlich wird. Übersteuern des Verstärkers durch eine Störspannung ist sicher dadurch ausgeschlossen, daß Eichimpulse vor, während und nach dem Stromfluß gleiche Amplituden hatten. Wir nehmen deshalb an, daß die bei der DNP-Vergiftung auftretende Abnahme der Amplituden der Miniatur-Epp bei anodischer Polarisation größerer Intensität, sowie die oben beschriebene Amplituden- und Frequenzzunahme bei kathodischem Stromfluß reelle Beobachtungen sind.

2. Reizantwort bei anodischer Polarisation. Hier werden schließlich die Ergebnisse 5 weiterer Experimente beschrieben, bei denen die Reizantwort, also das Epp, bei anodischer Polarisation der Nervenendigungen gemessen wurde. Es ist nämlich möglich, die Amplitude des durch eine längere Reizserie „ermüdeten" Epp durch schwache anodische Ströme wieder zu erhöhen (del Castillo u. Katz 1954c). Dasselbe ist

möglich, wenn das Epp durch Erhöhung der Mg-Konzentration reduziert ist. Die anelektrotonische Erhöhung des Ruhepotentials der Nervenendigungen führt also zu einer Art „Bahnung", wodurch von einem einzelnen Nervenreiz mehr sekretorische Einheiten aktiviert werden, die Amplitude des Epp größer wird. Der Versuch wird so durchgeführt, daß mittels einer am Endplattenfokus in eine Faser eingestochenen Elektrode die Antwort, d. h. das Epp auf sekündlichen Reiz abgeleitet wird (siehe z. B. Beginn der Abb. 12B). Nun wird mit ansteigendem anodischem Strom polarisiert, bis an der Ringer-Ölgrenzfläche Leitungsblock im Axon auftritt: die Reizantwort fällt aus. Bei einer Stromstärke, die wenig unterhalb derjenigen, die zum Leitungsblock führt, liegt, wird der erwartete Effekt beobachtet (siehe Abb. 12A und B).

Voraussetzung ist ein extrem kurzer Abstand zwischen der Öl-Ringer-Grenzfläche und den Nervenendigungen, denn nur an der Grenzfläche wird polarisiert, die Erhöhung des Ruhepotentials an dieser Stelle klingt auf- und abwärts nach einer Strecke von etwa 1 mm auf 1/e ab. Da der Polarisation an der Grenzfläche durch das Eintreten der Leitungsblockade eine Grenze gesetzt ist, sollte die Grenzflächen-Nervenendigungen-Distanz kleiner als 1 mm sein. Leitungsblock tritt ein bei einer Stromstärke, die etwa $^1/_3$—$^1/_2$ der zur Auslösung des „anodic burst"-Phänomens notwendigen Stärke entspricht.

Hier interessierte, ob und in welchem Ausmaß die durch DNP reduzierte Amplitude des Epp durch anodische Polarisation wieder vergrößert werden kann. Dies ist der Fall (siehe Abb. 12B) und besonders eindrucksvoll dann, wenn der DNP-Block fast völlig eingetreten ist und nach anodischer Polarisation teilweise wieder aufgehoben wird (siehe Abb. 12C). Die Aufhebung des Blockes gelingt freilich nur 1—2 min nach dessen Eintritt, vermutlich deshalb, weil die zu späterem Zeitpunkt notwendige größere Stromstärke wegen des eintretenden Leitungsblocks nicht appliziert werden kann.

Diskussion

Der Einfluß, den die Ca- und Mg-Konzentration auf die Geschwindigkeit der Entwicklung des DNP-Blockes hat (siehe Abb. 3 und 4), sowie die Möglichkeit, den Block durch repetitive Reizung (Bahnung) zu durchbrechen (siehe Abb. 8), waren erste Hinweise auf den präsynaptischen Angriffspunkt der Vergiftung. Ganz sinnfällig wird jener demonstriert im Versuch der Abb. 6. Dort war die Reizantwort, das Epp, auf die Antwort weniger sekretorischer Einheiten reduziert. DNP führt zum Ausfall weiterer Einheiten, bis schließlich jede Antwort auf Nervenreiz erlischt. Gegen einen eventuellen zusätzlichen postsynaptischen Angriffspunkt des DNP sprechen die Konstanz der Amplituden der Miniatur-Epp sowie die unveränderte Zeitcharakteristik der Epp des vergifteten Muskels.

Mögliche Mechanismen des DNP-Blockes

Drei präsynaptische Angriffspunkte des DNP, die zum Block der neuromuskulären Übertragung führen würden, seien hier betrachtet.

1. Die Invasion der Erregung von der Grenze des markhaltigen zum marklosen Abschnitt in die Nervenendigungen könnte gestört sein.

2. Die eigentliche „elektrosekretorische Kupplung", nämlich die normalerweise zwingende Bindung der ACh-Freisetzung an einen Membranprozeß in den Endigungen, verliert an Wirksamkeit.

3. Die ACh-Quelle könnte versiegen, indem unter DNP immer weniger „ACh-Quanten" oder solche immer kleineren ACh-Gehaltes produziert würden.

Von diesen 3 Möglichkeiten ist die 3. auf Grund unserer Experimente auszuschließen: die spontane ACh-Freisetzung, erkennbar an der Frequenz und den Amplituden der Miniatur-Epp, ist am vergifteten Muskel sogar erhöht, der Größenordnung nach auf etwa das 10fache; die Amplituden der Miniatur-Epp sind dabei nicht meßbar verändert. Für die Möglichkeiten 1. und 2. sprechen dagegen das Funktionieren der Bahnung und der Befund, daß der DNP-Block durch Anelektrotonus der Nervenendigungen aufhebbar ist. Bahnung und Anelektrotonus wirken wahrscheinlich nach gleichem Prinzip. Auch die Bahnung erhöht das Ruhepotential präsynaptischer Strukturen durch ein die spikes überdauerndes positives Nachpotential (gemessen bei der Bahnung eines Spinalreflexes, Lloyd 1949). Beides führt also zu einer Hyperpolarisation des marklosen Nervenabschnittes, bei der die Amplitude des Nervenaktionspotentials zunimmt (Schmitz u. Schaefer 1933, Lorente de Nó 1943); dadurch wird die normale und herabgesetzte Erregungsleitung verbessert, die erloschene unter Umständen wieder hergestellt.

Eine genauere Differenzierung des Angriffspunktes der Vergiftung auf der präsynaptischen Strecke im Sinne der Möglichkeiten 1. und 2. ist nur hypothetisch und der Versuch auch vielleicht nicht gerechtfertigt; das Gift wird Nervenfaser und Endigungen in gleicher Weise treffen. Immerhin sprechen einige Beobachtungen dafür, daß der Block im wesentlichen ein Faserblock ist. War das Epp durch Magnesium reduziert, so trat der Block meist ein, bevor die Miniaturfrequenz merklich zugenommen hatte (Versuch der Abb. 7). Wir schlossen aus dieser Beobachtung, die DNP-Vergiftung beginne sich zuerst proximal der Nervenendigungen bemerkbar zu machen. Inwieweit die Zunahme der Miniaturfrequenz überhaupt in unmittelbarer Beziehung zum Block steht, ist fraglich, denn, wenn Anelektrotonus den Block aufhebt, ist dabei die Miniaturfrequenz nicht betroffen. Ein ähnliches Argument zur Frage der Lokalisation liefert der Befund, daß selbst bei fortgeschrittener Vergiftung und fehlender Antwort auf Einzelreize nach einer Reizsalve die posttetanische Potenzierung in Form erhöhter Frequenz der Miniatur-Epp und Wiedererscheinen der Antwort auf Einzelreize noch auftritt; sogar dann noch, wenn der repetitive Reiz gar nicht mehr zu Antworten führt. Da der Mechanismus der posttetanischen Potenzierung in die Nervenendigungen verlegt wird (Hutter 1952, Brooks 1956), spricht dies dafür, daß diese in den Anfängen der Vergiftung nicht wesentlich betroffen sind.

Miniatur-Epp

Man könnte die Erhöhung der Frequenz der Miniatur-Epp beim vergifteten Muskel als ein Analogon zur Frequenzzunahme bei Katelektrotonus der Endigungen betrachten. Das Gegenargument, kathodische Depolarisation führe bei hoher Mg-Konzentration nicht zu einer Zunahme der Frequenz der Miniatur-Epp (siehe Abb. 6 DEL CASTILLO u. KATZ 1954d), scheint für unsere Versuche, die bei niedrigerer Mg-Konzentration durchgeführt wurden, nicht stichhaltig. Wir beobachteten regelmäßig die Zunahme der Frequenz der Miniatur-Epp bei kathodischer Polarisation. In jedem Falle führt auch am DNP-vergifteten Präparat Katelektrotonus zu weiterer, je nach Stromstärke beträchtlicher Zunahme der Frequenz, die den Stromfluß längere Zeit überdauert. Im Sinne unserer vereinfachenden Annahme der Analogie der Zunahme der Miniatur-Epp bei der DNP-Vergiftung zu der bei kathodischer Polarisation spricht die Abnahme der Frequenz bei schwachem, gering unterhalb der „burst"-Schwelle liegendem anodischem Strom. Dieser Effekt erinnert an das beim Warmblüter gefundene Verhalten, bei dem anodische Polarisation immer zu Frequenzabnahme und nicht zum „burst"-Phänomen führt (LILEY 1956).

Die zur Auslösung der kathodischen und anodischen Effekte notwendige Stromstärke muß mit zunehmender Vergiftungszeit laufend erhöht werden. Mehr als eine fortschreitende Desorganisation und Zerstörung, mit Abnahme des präsynaptischen Membranwiderstandes, kann daraus kaum erschlossen werden. Auch müssen die überraschenden Wirkungen größerer Stromstärken in diesem Vergiftungsstadium ohne weitere Kenntnis der Neurosekretion an der Endplatte ohne Deutung bleiben.

Zur Frage der Spezifität der DNP-Vergiftung

Die Frage mag hier noch interessieren, ob der DNP-Wirkung eine Spezifität zukommt. Von 2,4-Dinitrophenol ist bekannt, daß es die Phosphorylierung von der Oxydation entkoppelt, wodurch der Nutzeffekt der aus der Atmung stammenden Energie bei erhöhter Ruheatmung herabgesetzt wird (siehe CHANCE u. WILLIAMS 1956). Im Zusammenhang damit steht wohl die blockierende Wirkung auf die sog. Natriumpumpe. DNP reduziert in Konzentrationen, die entkoppeln und die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, den Natrium-Abschub aus einer marklosen Nervenfaser (HODGKIN u. KEYNES 1955). Gegen die Annahme einer Spezifität des DNP beim beschriebenen Block der neuromuskulären Übertragung hat sich jedoch in später zu beschreibenden Experimenten gezeigt, daß andere Stoffwechselhemmer, wie z. B. Cyanid plus Monojodessigsäure, zum gleichen Vergiftungsbild, nämlich zum präsynaptischen Block, führen.

Zusammenfassung

1. 2,4-Dinitrophenol (DNP) führt in Konzentrationen von 0,2 und 0,1 mMol bei sekündlicher Reizung des Nervs zu schneller Erschöpfung und zu irreversiblem Block der neuromuskulären Übertragung.

2. Bei repetitiver Reizung tritt die Erschöpfung, gemessen an der Amplitude des Endplattenpotentials, bei hohem Ca-Gehalt der Ringer-Lösung früher und bei hohem Mg-Gehalt später ein.

3. Das durch Erhöhung der Mg-Konzentration auf die Antwort weniger sekretorischer Einheiten reduzierte Endplattenpotential wird durch DNP infolge Ausfalls weiterer Einheiten bis auf die Antwort von der Amplitude eines spontanen Miniatur-Endplattenpotentials verkleinert. Schließlich erlischt jede Antwort, und Block tritt ein.

4. Bahnung durch repetitive Reizung hebt den DNP-Block wieder auf. Die Reizsalve muß hier um so länger dauern, je länger die Vergiftungszeit bereits ist.

5. Die Frequenz der spontanen Miniatur-Endplattenpotentiale ist unter der DNP-Wirkung stark erhöht, die Amplituden der Miniatur-Endplattenpotentiale sind jedoch bis zum Sistieren der Spontantätigkeit unverändert.

6. Anodische Ströme geringer Stärke (meist unter 1 μAmp) können das nach DNP-Gabe reduzierte Endplatten-Potential vergrößern und einen Block aufheben.

7. Etwa 3fach stärkere Ströme führen zum „anodic burst"-Phänomen der Spontantätigkeit; zu seiner Auslösung werden im Verlaufe der Vergiftung immer größere Ströme notwendig. Ströme, die nur wenig unter der „burst"-Schwelle liegen, führen mitunter zu einer Abnahme der Frequenz und der Amplituden der Miniatur-Endplattenpotentiale.

8. Kathodische Ströme führen nur während des Stromflusses zur Zunahme der Frequenz der Miniatur-Endplattenpotentiale. Nach DNP ist diese Zunahme stärker und überdauert den Stromfluß.

Die Befunde beweisen den präsynaptischen Angriffspunkt der Vergiftung und machen eine Depolarisation auf der präsynaptischen Strecke als Ursache wahrscheinlich.

Literatur

Brooks, V. B.: An intracellular study of the action of repetitive nerve volleys and of Botulinum toxin on miniature end-plate potentials. J. of Physiol. **134**, 264—277 (1956). — Chance, B., and G. R. Williams: The respiratory chain and oxydative phosphorylation. Adv. Enzymol. **18**, 65—134 (1956). — del Castillo, J., and B. Katz: (a) The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. J. of Physiol. **124**, 553—559 (1954). — (b) Quantal components of the end-plate potential. J. of Physiol. **124**, 560—573 (1954). — (c) Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. J. of Physiol. **124**, 574—585 (1954). —

(d) Changes in end-plate activity produced by pre-synaptic polarization. J. of Physiol. **124**, 586—604 (1954). — Biophysical aspects of neuromuscular transmission. Progr. in Biophys. and biophys. Chemistry **6**. London & New York: Pergamon press (1956). — Eccles, J. C., B. Katz and S. W. Kuffler: Nature of the „end-plate potential" in curarized muscle. J. of Neurophysiol. **5**, 362—387 (1941). — Fatt, P. and B. Katz: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. J. of Physiol. **117**, 109—128 (1952). — Feng, T. P.: (a) The local activity around the skeletal n-m junctions produced by nerve impulses. Biol. Symp. **3**, 121—152 (1941) — (b) The changes in the end-plate potential during and after prolonged stimulation. Chin. J. Physiol. **16**, 341—372 (1941). — Hodgkin, A. L., and R. D. Keynes: Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. J. of Physiol. **128**, 28—60 (1955). — Hutter, O. F.: Post-tetanic restoration of neuromuscular transmission blocked by D-tubocurarine. J. of Physiol. **118**, 216—227 (1952). — Hutter, O. F., and W. Trautwein: Neuromuscular facilitation by stretch of motor nerve endings. J. of Physiol. **133**, 610—625 (1956). — Kuffler, S. W.: Transmitter mechanism at the nerve-muscle junction. Arch. Sci. physiol. **3**, 585 — 601 (1949). — Liley, A. W.: The effects of presynaptic polarization on the spontaneous activity at the mammalian neuromuscular junction. J. of Physiol. **134**, 427—443 (1956). — Lloyd, D. P. C.: Post-tetanic potentiation of response in the monosynaptic reflex pathway of the spinal cord. J. Gen. Physiol. **33**, 147—170 (1949). — Loewenstein, W. R., and A. Szent-Györgyi: The effect of Dinitronaphthol on the membrane potential of the skeletal muscle fiber. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **46**, 345 (1955). — Lorente de Nó, R.: A Study of Nerve Physiology, part 2, ch. 14. Studies of Rockefeller Inst. med. Res. **132** (1941). — Schaefer, H., u. P. Haass: Über einen lokalen Erregungsstrom an der motorischen Endplatte. Pflügers Arch. **242**, 364—381 (1939). — Schmitz, W., u. H. Schaefer: Der Aktionsstrom des polarisierten Nerven. Pflügers Arch. **232**, 713—726 (1933). — Trautwein, W., u. H. G. Kraatz: Die Wirkung eines Stoffwechselgiftes (2,4-Dinitrophenol) auf die neuromusculäre Übertragung. 23. Tagung der dtsch. Physiol. Ges., Münster (1957). Pflügers Arch., im Druck.

Dozent Dr. Wolfgang Trautwein und Dr. Hans Günter Kraatz,
Physiologisches Institut der Universität Heidelberg, Akademiestr. 3

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 440—454 (1957)

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel)

Pankreatektomie und Cortisonwirkung bei Meerschweinchen

Von
Kurt Weinges und Helmut Maske

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 20. April 1957)

In der vorhergehenden Mitteilung[22] wurden ältere Untersuchungen über die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber der diabetogenen Alloxanwirkung nachgearbeitet und bestätigt. Darüberhinaus wurde festgestellt, daß sich beim Meerschweinchen auch mit Dithizon kein Diabetes erzeugen läßt; als Ursache wurde das Fehlen von histochemisch nachweisbarem Zink in den Langerhansschen Inseln angenommen. Während bisher in der Literatur immer nur die Alloxanresistenz als besondere Eigenart des Meerschweinchens diskutiert wurde, deuten verschiedene Beobachtungen daraufhin, daß die Unterschiede zwischen dem Stoffwechsel dieser Species und dem anderer Laboratoriumstiere darüberhinausgehen. Der wesentlich geringere Insulingehalt des Meerschweinchenpankreas, das Fehlen von histochemisch nachweisbarem Zink in den Inseln, die bei anderen Tierarten lange nicht so ausgeprägte Wirkung von Kobaltsalzen auf die A-Zellen der Langerhansschen Inseln und die bisher nicht besonders beachtete Tatsache, daß bei Meerschweinchen noch niemals und mit keiner der zur Verfügung stehenden Methoden ein bleibender Diabetes erzeugt wurde, sind in der vorhergehenden Mitteilung ausführlich besprochen worden. In der vorliegenden Arbeit wird über die Wirkung weiterer diabetogener Eingriffe bei Meerschweinchen berichtet.

Die exogene Zufuhr von sogenannten Glucocorticoiden, besonders von Cortison und Hydrocortison, führt je nach der Dosis und der Behandlungsdauer zur Hyperglykämie, zur Glucosurie und zu einem Anstieg des Leberglykogens. Die Kohlenhydrattoleranz wird herabgesetzt. Diese Störung des Kohlenhydratstoffwechsels ist bei Gesunden nur vorübergehend. Ingle[16,17], der als erster Änderungen des Kohlenhydratstoffwechsels während der Cortisonbehandlung beobachtete, führte für diesen Zustand dann später auch den Begriff des „Steroiddiabetes" ein.

Als Ursache der diabetischen Stoffwechselstörung wurde eine Insulin-antagonistische Wirkung des Cortisons in verschiedenen Bereichen des intermediären Stoffwechsels nachgewiesen. Cortison bewirkt eine vermehrte Gluconeogenese aus Eiweiß, während Insulin, wie kürzlich von Salter u. Best[25] nachgewiesen wurde, die Eiweißsynthese fördert. Da die Zuckerausscheidung bei Tieren mit Steroiddiabetes jedoch höher ist als einer anhand der Stickstoffausscheidung errechneten

Neubildung aus Eiweiß entspricht[20], muß man über die Gluconeogenese hinaus noch eine Störung der Kohlenhydratverwertung als weitere Ursache der Hyperglykämie und Glucosurie annehmen. Dem entspricht die von Colowick, Cori u. Slein[5] nachgewiesene Hemmung der Hexokinasereaktion durch die Nebennierenrinde. Auch im Bereich des Fettstoffwechsels wurde ein Antagonismus von Insulin und Cortison sowohl am lebenden Tier als auch an isolierten Organen demonstriert. Während Insulin die Fettneubildung aus Glucose und Essigsäure fördert, wird unter dem Einfluß von Cortison vermehrtes Fett abgebaut und es kommt zur Ketonurie[3,9,26].

Ein einheitlicher Ort der Insulin-antagonistischen Steroidwirkung im intermediären Stoffwechsel konnte bisher nicht sicher nachgewiesen werden. Über die reine Stoffwechselwirkung hinaus wird ein unmittelbarer Einfluß der Glucocorticoide auf die Langerhansschen Inseln diskutiert[2,19]. Es konnte bis heute allerdings nicht sicher festgestellt werden, ob die Inselzellen unter den Bedingungen des Steroiddiabetes weniger, mehr oder normale Insulinmengen produzieren bzw. abgeben. Hausberger[12,13] beobachtete an Meerschweinchen eine Vergrößerung der Inseln im Verlauf einer Behandlung mit Cortison. Fabrini[8] konnte die Veränderungen an den Pankreasinseln bei derselben Tierart während der Cortisonbehandlung durch eine gleichzeitige Insulinapplikation verhindern. Er nimmt infolgedessen an, daß die durch Cortison erzeugte Inselhyperplasie lediglich auf die durch Cortison erzeugte Hyperglykämie zurückzuführen ist. Systematische Untersuchungen über das Ausmaß der Inselzellvergrößerung und über eventuelle Verschiebungen im Verhältnis der A- und B-Zellen wurden bisher jedoch nicht durchgeführt. Andere Untersucher beobachteten nach längerdauernder Behandlung mit Cortison oder Hydrocortison ähnliche Veränderungen an den Langerhansschen Inseln von Ratten[10,14], Kaninchen[2,19], Katzen[1], Hunden[1] und Affen[24].

In der vorliegenden Arbeit wird über das Verhalten des Blutzuckers und über histologische Veränderungen an den Langerhansschen Inseln des Pankreas bei Meerschweinchen nach Teilpankreatektomie, nach Behandlung mit steigenden Cortisondosen und nach Cortisonbehandlung vorher teilpankreatektomierter Tiere berichtet. Dabei wurden die bereits vorliegenden Beobachtungen durch histometrische Messungen über die Größe der Inseln und durch die Auszählung Von A- und B-Zellen ergänzt.

Methoden und Material

Die Versuche wurden an mischrassigen Meerschweinchen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Die Tiere erhielten Mischfutter nach Belieben.

Blutzucker wurden nach Hagedorn-Jensen bestimmt. Das dazu notwendige Blut wurde entweder aus den Ohrvenen oder bei den in Narkose durchgeführten Untersuchungen aus den freigelegten Schenkelvenen entnommen.

Cortison wurde in Form einer Cortison-Acetat-Suspension* (25 mg/cm^3) subcutan injiziert. Die Tagesdosis wurde in zwei Portionen mit 10—12 Std Abstand verabreicht.

Glucosebelastungen wurden bei einzelnen Tieren entsprechend den methodischen Angaben in der vorhergehenden Mitteilung[22] durchgeführt.

Zur histologischen Untersuchung wurde das Pankreas jeweils in Bouinscher Flüssigkeit fixiert. 3—5 μ dicke Schnitte wurden entweder mit der Chrom-Hämatoxilin-Phloxin-Methode nach Gomori[11] oder mit einer selbstentwickelten Methode[21] gefärbt.

* Wir danken der Orgapharm für die Überlassung der Cortisonpräparate.

Zu histometrischen Untersuchungen wurde die Fläche des längsgeschnittenen Pankreas und die Fläche der Langerhansschen Inseln mit einem Integrationsokular (Leitz, Wetzlar) ausgemessen. Die A- und B-Zellen wurden mit Hilfe eines Zählokulars ausgezählt und die Prozentzahl des A-Zellenanteils an allen Inselzellen jeweils aus 2000—4000 pro Tier ausgezählten Zellen errechnet. Wenige nicht genau zu differenzierende Zellen wurden nicht mitgezählt.

Zum histochemischen Nachweis von Zink wurde den Tieren 100 mg Dithizon/kg K. Gew. langsam injiziert und anschließend Gefrierschnitte des Pankreas hergestellt. Zur Injektion wurde eine Lösung von 100 mg Dithizon in einer Mischung von 1 cm^3 absolutem Alkohol und 4 Tropfen konzentriertem Ammoniak mit 5—10 Teilen destilliertem Wasser verdünnt.

Ergebnisse

A. Teilweise Pankreatektomie

Teilweise Pankreatektomien wurden in Äthernarkose durchgeführt. Nach der Unterbindung der zu- und abführenden Blutgefäße wurde das Pankreas von seinem Milzteil her so weit als möglich freipräpariert und nach dem Abbinden des Pankreasstumpfes mit Seide wurde der freipräparierte Rest mit dem Thermokauter abgetragen. Bei einem verhältnismäßig großen Teil der Tiere wurden Komplikationen und Blutungen beobachtet, die wohl auf die Operationstechnik zurückzuführen waren. In den Ergebnissen sind lediglich die komplikationslos überlebenden Tiere berücksichtigt.

Um einen Anhaltspunkt für das Gewicht des gesamten soliden Pankreasanteils bei gesunden Meerschweinchen zu erhalten, wurden 25 gesunde Tiere nach dem Tode pankreatektomiert, das Fett möglichst weitgehend entfernt und das Pankreas in Beziehung zum Körpergewicht gesetzt. Als durchschnittliches Pankreasgewicht ergab sich infolgedessen 0,27% $\pm$ 0,04* des Körpergewichts. Dieser Wert wurde als Basis zur Errechnung des entfernten Pankreasanteils herangezogen.

13 Tiere, bei denen 52—81% des Gesamtpankreas entfernt worden waren, überlebten mindestens 6 Tage. Lediglich bei einem dieser Tiere wurde am dritten Tag nach dem operativen Eingriff ein Blutzuckerwert über 200 mg-% gefunden. Auch bei Blutzuckeruntersuchungen, die bei einzelnen Tieren bis zu 2 Monaten nach dem Eingriff durchgeführt wurden, fanden sich keine erhöhten Werte.

Bei einigen orientierend durchgeführten Glucosebelastungen lagen die Blutzucker zwar über dem Durchschnitt der Kurven von normalen Tieren, der Kurvenverlauf kann jedoch noch nicht als typisch diabetisch bezeichnet werden.

Die an einzelnen Tieren durchgeführten histologischen Untersuchungen des Restpankreas ergaben eine erhebliche Zunahme des Inselvolumens im Verhältnis zum exkretorischen Gewebe. Es konnten jedoch nur

---

* Die mittlere Abweichung vom Mittelwert wurde nach folgender Formel errechnet: $\sigma = \pm \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{W} (M - x_i)^2}$

wenige Drüsenreste untersucht werden, da bei den meisten Tieren kein Restpankreas mehr gefunden wurde. Die relative Zunahme des Inselgewebes kann sowohl mit einer kompensatorischen Regeneration von Inselgewebe als auch mit einem Rückgang des exkretorischen Gewebes erklärt werden.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen überrascht nicht, da nach älteren Erfahrungen auch bei anderen Tierarten die Entwicklung eines bleibenden Diabetes erst nach der Entfernung von etwa $^{9}/_{10}$ des Gesamtpankreas zu erwarten ist. Eine derartige Operation ist jedoch bei Meerschweinchen kaum durchzuführen, weil ein Teil der Drüse in das Netz eingelagert ist und weil die Blutversorgung des Pankreaskopfes zum Teil mit der des oberen Dünndarmes identisch ist, sodaß Dünndarmnekrosen die Folge der notwendigen Gefäßunterbindungen sind. Die in diesem Abschnitt berichteten Untersuchungen waren Voraussetzung für die unter C zu besprechenden Veränderungen nach der Cortisonbehandlung teilpankreatektomierter Tiere.

B. Behandlung mit Cortison

Die Cortisonbehandlung wurde bei verschiedenen Gruppen von Tieren variiert. Die Dosis wurde dabei mehr oder weniger gesteigert, um eine möglichst intensive Cortisonwirkung zu erhalten und um die Wirkung der zu erwartenden kompensatorischen Mehrsekretion von Insulin nach Möglichkeit zu übertreffen.

Die erste Gruppe erhielt während der ersten acht Tage zweimal täglich 1,25 mg Cortison und anschließend die doppelte Dosis verabreicht. Bei einer weiteren Gruppe wurde die Cortisonmenge jeden vierten Tag verdoppelt, bis eine Tagesdosis von 20 mg erreicht wurde; und bei einer dritten Gruppe wurde die Dosis jeden dritten Tag um 5 mg/Tag bis zu einer Tagesdosis von 50 mg erhöht. Das einzelnen Tieren insgesamt verabreichte Cortison reichte von 10—550 mg und wurde innerhalb von 5—20 Tagen injiziert.

An den Injektionsstellen wurden bei verschiedenen Tieren noch ein bis zwei Wochen nach Abschluß der Behandlung Cortisonreste in Gestalt kleiner Röhrchen gefunden. Die Ursache für diese unerwartete Resorptionsverzögerung mag in einer örtlichen Wirkung des Cortisons liegen. Es wird besonders auf diese Beobachtung hingewiesen, da manche von anderen Autoren gefundene länger anhaltende Stoffwechselwirkung des Cortisons vielleicht auf eine ungewöhnlich langsame Resorption des Steroids zurückzuführen ist.

Blutzucker und Körpergewicht wurden regelmäßig während des Versuches kontrolliert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten nach Abschluß der Cortisonbehandlung getötet, um nach Möglichkeit einen Einblick in die Entwicklung der histologischen Veränderungen zu erhalten. Bei einer größeren Anzahl von Tieren wurde außer den histologischen Untersuchungen noch versucht, histochemisch Zink nachzuweisen. Jedes Tier war mindestens 24 Std Cortison-frei und 12 Std nüchtern, bevor es getötet wurde. Cortisondosierung und Blutzucker sind aus Tab. 1 zu entnehmen.

Tabelle 1. *Blutzuckerwerte bei mit Cortison behandelte*

Nr. Geschl.	Versuchsdauer	Tag 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Versuchsreihe a)														
749 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→			+								
	Blutz. mg-%					105								
760 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→						+					
	Blutz. mg-%					103			126					
751 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→							2 · 2,5	+			
	Blutz. mg-%					112			125					
761 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→							2 · 2,5	→		+	
	Blutz. mg-%					105			104				96	
753 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→							2 · 2,5	→			
	Blutz. mg-%					142			116				122	
752 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→							2 · 2,5	→			
	Blutz. mg-%					108			109				121	
763 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→							2 · 2,5	→			
	Blutz. mg-%					80			123				148	
762 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→							2 · 2,5	→			
	Blutz. mg-%					93			116				137	
Versuchsreihe b)														
764 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	+								
	Blutz. mg-%					96								
724 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→	2 · 2,5	→				2 · 5,0	→	2 · 10,0	→		
	Blutz. mg-%	134		117	109	132					145	158		
725 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→	2 · 2,5	→				2 · 5,0	→	2 · 10,0	→		
	Blutz. mg-%	161		107	108	134					140	183		
726 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→	2 · 2,5	→				2 · 5,0	→	2 · 10,0	→		
	Blutz. mg-%	152		123	116	210					120	154		
727 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 1,25	→	2 · 2,5	→				2 · 5,0	→	2 · 10,0	→		
	Blutz. mg-%	154		100	104	168					97	185		
Versuchsreihe c)														
754 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	+		
	Blutz. mg-%					86			166					
767 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	Blutz. mg-%					112			116				188	
757 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	Blutz. mg-%					105			134				77	
756 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	Blutz. mg-%					114			128				153	

erschweinchen. a, b und c sind Gruppen mit verschiedener Dosierung

Tag												Gesamtdosis	Bemerkungen
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
suchsreihe a)														
													10 mg	Zinknachweis ø
													17,5 mg	Zinknachweis ø
													25 mg	Zinknachweis ø
													32,5 mg	Zinknachweis ø
	93												50 mg	Zinknachweis ø
→ 114				144			140					92	70 mg	nicht getötet
→ 109				134			106					97	70 mg	nicht getötet
→ 82				112			105					116	70 mg	7 Monate später trächt. nicht getötet
suchsreihe b)														
			+										30 mg	Zinknachweis ø
		84		+									112,5 mg	Zinknachweis ø
		103		190									112,5 mg	Zinknachweis ø
→		161		157	+	239				173			172,5 mg	+ 31. Tag Blutz. 116 mg-%
→		177		228									172,5 mg	Zinknachweis ø
suchsreihe c)														
													150 mg	Zinknachweis ø
→	130			150				280				121	297,5 mg	7 Wo. nach letztem Cortison +
2 · 20	+ 257												320, mg	
2 · 20	→	2 · 22,5	+										405 mg	

Tabelle 1 (Fortsetzu

Nr. Geschl.	Versuchsdauer	Tag 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
755 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	Blutz. mg-%					128			148				128	
758 ♂	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	Blutz. mg-%					101			170				198	
765 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	Blutz. mg-%					93			123				95	
768 ♀	tgl. Dos. mg	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	Blutz. mg-%					128			118				160	
766 ♀	Blutz. mg-%	2 · 2,5	→	2 · 5,0	→	2 · 7,25	→	2 · 10,0	→	2 · 12,5	→	2 · 15,0	→	2 · 17
	tgl. Dos. mg					82			121				233	

1. Das Verhalten des Körpergewichtes. Die Tiere nahmen während der Vorbeobachtungszeit von 14 Tagen zwischen 10 und 20 g an Gewicht zu. Während der ersten 4—5 Tage der Cortisonbehandlung stieg das Gewicht der Tiere mit zwei Ausnahmen wesentlich stärker an, bei den meisten zwischen 20 und 50 g. Im Verlauf der weiteren Behandlung verhielt sich das Gewicht nicht mehr so einheitlich. Nur wenige Tiere zeigten einen wenn auch langsameren Anstieg des Gewichtes über längere Zeit. Nach unterschiedlicher Behandlungsdauer wurde bei fast allen länger behandelten Tieren ein mehr oder weniger lange anhaltender Gewichtsverlust beobachtet. Die Werte vom Versuchsbeginn wurden jedoch nur von wenigen wieder erreicht und nur von einem der länger behandelten Tiere unterschritten. Bei einigen Tieren wurde ein Gewichtsverlust nach dem Absetzen des Cortisons festgestellt.

2. Das Verhalten des Blutzuckers. Bei der ersten Gruppe von Tieren (Tab. 1a) mit gleichbleibender oder nur sehr langsam gesteigerter Cortisondosis wurde keine Erhöhung des Blutzuckers über die in der vorhergehenden Arbeit als Normalbereich gefundenen Werte hinaus beobachtet (Normalbereich: 124 $\pm$ 53 mg-%).

Bei der zweiten Gruppe (Tab. 1b), die mit progressiv gesteigerter Dosis von Cortison behandelt wurde, fanden sich regelmäßig vorübergehende Blutzuckersteigerungen nach einer Behandlungsdauer von 12 bis 14 Tagen, und nachdem eine Gesamtdosis von 150 mg erreicht wurde. Der höchste dabei beobachtete Wert betrug 239 mg-%.

Die Blutzucker der dritten Gruppe (Tab. 1c) mit langsamerer Steigerung, aber höheren Einzel- und Gesamtdosen von Cortison zeigten ein weniger regelmäßiges Verhalten als die der zweiten Gruppe. Es wurde nur bei 4 von 9 Tieren eine Steigerung über normale Werte gefunden. Die auch hier zuerst nach 12 Tagen beobachtete Erhöhung des Blutzuckers

rsuchsreihe c)

Tag													Gesamt-dosis	Bemerkungen
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
2 · 20	→ 114	2 · 22,5	+										405 mg	
2 · 20	→ 148	2 · 22,5	2 · 25	242		+ 100							455 mg	Zinknachweis ⌀
2 · 20	→ 104	2 · 22,5	→	2 · 25	→ 112			116				114	550 mg	10,5 Wo. nach letztem Cortison +
2 · 20	→ 96	2 · 22,5	→	2 · 25 120	→			119				90	550 mg	10,5 Wo. nach letztem Cortison +
2 · 20	→ 130	2 · 22,5	→	2 · 25 139	→			131		+			550 mg	Spontantod

war jedoch ebenfalls, soweit die Beobachtungszeit ausreicht, immer nur vorübergehend. Der höchste Wert betrug 280 mg-%. Später als 8 Tage nach dem Absetzen des Cortisons wurden keine erhöhten Blutzucker mehr gefunden. Harnzuckeruntersuchungen wurden nicht durchgeführt, da nach früher durchgeführten Untersuchungen die Nierenschwelle für Glucose im Verlauf des Steroiddiabetes durch eine Reduzierung der tubulären Rückresorption herabgesetzt wird[6,7,18,23].

3. Histologie der Langerhansschen Inseln. Bei der Durchsicht der Präparate mit kleiner Vergrößerung fiel eine Zunahme der Inselzahl und das Vorkommen sehr großer Inseln auf. Mit stärkerer Vergrößerung wurden außerdem noch viele kleine Inseln mit weniger als 10 Zellen gefunden. Die kleinen Inseln bestanden fast ausschließlich aus B-Zellen. Abb. 1 demonstriert die Häufigkeit verschieden großer Inseln bei normalen und bei einem mit Cortison behandelten Tier. Die B-Zellen erschienen vergrößert und die Mehrzahl zeigte eine reduzierte Granulierung. Es wurden jedoch keine weiteren Veränderungen, wie Plasmavakuolen oder Kernpyknosen gefunden. Die A-Zellen erschienen normal. Die Inseln wurden gezählt und ausgemessen und das Verhältnis von A- und B-Zellen festgestellt. Die Messungen und Zählungen wurden in allen Fällen an längsgeschnittenen Präparaten des Pankreas durchgeführt.

An fünf normalen Tieren wurden zunächst Vergleichswerte gewonnen, die in Tab. 2 (S. 449) zusammengestellt sind. Der prozentuale Anteil der Inselfläche an der Fläche des gesamten Pankreas betrug durchschnittlich 1,2%. Der durchschnittliche prozentuale Anteil der A-Zellen an allen Inselzellen war 19%. Die Häufigkeit der Inseln zeigte eine größere Variationsbreite als die vorhergehenden Werte; der Durchschnitt war 26 Inseln pro 10 mm².

Bei den mit Cortison behandelten Tieren waren sowohl der prozentuale Anteil der Inselfläche als auch die Inselzahl pro Fläche durchgehend deutlich erhöht (Tab. 3, S. 450). Die Werte unterschieden sich so deutlich auch von den Grenzwerten der normalen Tiere, daß diese Beobachtung außerhalb der Diskussion steht. Eine statistische Bewertung der Ergebnisse wurde wegen der unterschiedlichen Behandlung der Tiere mit Cortison nicht durchgeführt. Der prozentuale Anteil der A-Zellen war ebenfalls bei

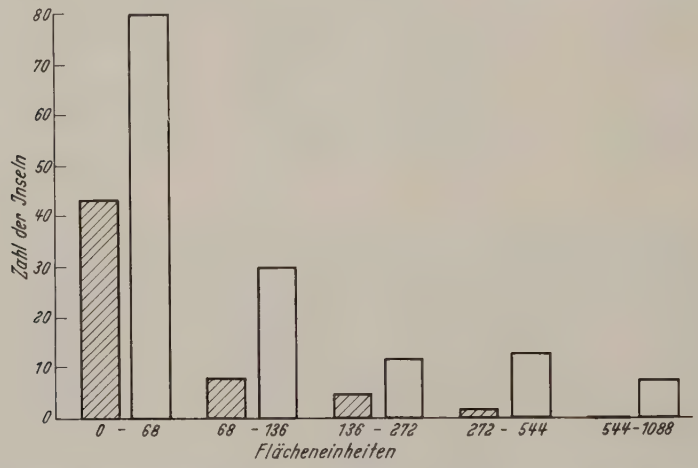


Abb. 1. Beispiel für die Häufigkeit von Inseln verschiedener Größe bei einem mit Cortison behandelten Meerschweinchen. ▨ Mittelwert von 5 normalen Tieren, □ mit Cortison behandeltes Tier

allen mit Cortison behandelten Tieren erheblich reduziert. Die Zunahme des Inselgewebes erfolgte infolgedessen in erster Linie auf Grund eines vermehrten B-Zellenzuwachses.

Auffallend erscheint, daß die Zunahme der Inselfläche bei den Tieren am ausgeprägtesten war, die 6—16 Tage nach Abschluß der Cortisonbehandlung getötet wurden. Die Vergrößerung der Inselfläche war nicht so ausgeprägt bei Tieren, die unmittelbar nach Abschluß der Behandlung oder sehr viel später getötet wurden. Die größte Zunahme der Inselzahl wurde bei einem trächtigen und mit Cortison behandelten Tier beobachtet. Bei einem Vergleich der mit unterschiedlichen Dosen behandelten Tiere zeigt sich, daß die absolute verabreichte Dosis des Steroids weniger Einfluß zu besitzen scheint als die Dauer der Behandlung. Es konnte jedoch weder eine Dosiswirkungskurve noch eine Wirkungskurve in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer aufgestellt werden.

4. Histochemische Untersuchungen. Ausgehend von der Vorstellung, daß im Verlauf einer forcierten Insulinproduktion bzw. Sekretion vielleicht soviel Zink angereichert wird, daß es histochemisch dargestellt werden kann, wurden dementsprechende Untersuchungen an 11 Tieren

nach mehr oder weniger lang dauernder Cortisonbehandlung durchgeführt. Um an ein und demselben Tier histologische und histochemische Beobachtungen machen zu können, wurde in Äthernarkose erst ein Teil des Pankreas zur Fixation in Bouinscher Lösung entfernt und dann Dithizon zum histochemischen Zinknachweis injiziert. Es konnte jedoch bei keinem der Tiere Zink nachgewiesen werden.

C. Cortison bei teilpankreatektomierten Meerschweinchen

Sechs teilpankreatektomierte Meerschweinchen, denen 4—11 Tage vor Beginn der Behandlung 55—81% des Pankreas entfernt worden waren, erhielten über einen Zeitraum von 14—47 Tagen täglich 25 bzw.

Tabelle 2. *Histometrische Ergebnisse an normalen Meerschweinchen*

Nr.	K. Gew. g	ausgemessene Schnittfläche mm²	Prozent. Anteil Inselfläche	ausgezählte Inselzellen	Prozent. Anteil A-Zellen	Inselzahl pro 10 mm²
801	525	25,24	0,87	2466	18,4	19,0
802	490	17,78	1,15	2387	20,6	19,1
803	545	23,58	1,36	2411	19,9	33,8
804	536	14,55	1,50	2500	20,0	31,0
805	486	30,31	1,23	2612	17,9	27,7
			$m = 1{,}2\%$		$m = 19\%$	$m = 26\%$

50 mg Cortison (Tab. 4, S. 452). Alle bis auf zwei Tiere nahmen im Verlauf der Cortisonbehandlung an Körpergewicht zu. Bei der Mehrzahl wurde nur ein vorübergehender Rückgang des Gewichtes beobachtet.

Auch in dieser Gruppe fanden sich überraschenderweise nur bei der Hälfte der Tiere vorübergehende Blutzuckersteigerungen. Bei zwei Tieren wurden mehrfach erhöhte Blutzucker bestimmt; bei dem einen wurden später wieder normale Werte gefunden, während das andere vier Tage nach einem maximalen Blutzucker von 331 mg-% einging (Nr. 789). Zwei weitere Tiere dieser Gruppe gingen nach 14- bzw. 28tägiger Behandlung ein, ohne daß vorher der Blutzucker erhöht war. Da bei Nr. 789 neben der Blutzuckersteigerung kein wesentlicher Gewichtsverlust beobachtet wurde — es wurde nicht einmal das Ausgangsgewicht erreicht — wird auch nicht angenommen, daß die durch Cortison hervorgerufene Kohlenhydratstoffwechselstörung die Todesursache war. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, daß eine der bei längerdauernder Cortisonbehandlung verhältnismäßig häufigen Infektionen für den Tod verantwortlich zu machen ist.

Leider waren histometrische Messungen an den Inseln dieser Tiere nicht möglich, da bei der Sektion wenn überhaupt nur so geringe Mengen Pankreasgewebe gefunden wurden, daß eine quantitative Auswertung wie bei den vorher beschriebenen Versuchen nicht durchgeführt werden konnte. Die histologischen Untersuchungen zeigten jedoch etwa das

Tabelle 3. *Histometrische Ergebnisse an mit Cortison behandelten Meerschweinchen*

Nr.	K. Gew. g bei Vers. Ende	Behandlungsdauer Tage	Gesamtdosis Cortison mg	ausgemessene Schnittfläche mm²	Prozent. Anteil Inselfläche	ausgezählte Inselzellen	Prozent. Anteil A-Zellen	Inselzahl pro 10 mm²	Bemerkungen
759	—	3	12,5	19,60	5,9	4000	10,7	107,7	trächtig
749	595	4	10	29,09	3,0	4000	11,1	66,3	2 Tage nach Cortison +
760	322	7	17,5	18,22	3,1	2000	15,0	62,6	1 Tag nach Cortison +
751	364	9	25	22,67	3,6	4000	8,6	45,8	1 Tag nach Cortison +
761	261	10	32,5	13,93	2,3	2000	6,1	71,8	2 Tage nach Cortison +
753	442	14	50	19,55	4,6	4000	10,2	56,8	2 Tage nach Cortison +
764	269	4	30	19,45	2,1	3412	10,8	48,3	1 Tag nach Cortison +
724	536	12	112,5	26,34	8,6	4000	11,7	59,6	6 Tage nach Cortison +
725	550	12	112,5	21,59	6,6	4000	12,6	44,5	7 Tage nach Cortison +
754	310	10	150	18,31	3,4	4000	11,3	55,7	1 Tag nach Cortison +
726	544	15	172,5	15,85	9,0	4000	16,0	36,6	16 Tage nach Cortison +
757	248	15	320	22,97	2,4	3900	10,2	27,4	1 Tag nach Cortison +
756	283	17	405	22,82	3,3	4000	7,7	79,3	1 Tag nach Cortison +
755	246	17	405	23,58	5,9	4000	11,5	37,7	1 Tag nach Cortison +
758	304	18	455	17,92	5,8	4000	11,3	36,8	3 Tage nach Cortison +
765	230	20	550	18,83	3,5	4000	11,7	45,7	10,5 Wo. nach Cortison +
768	295	20	550	23,89	3,4	4000	15,5	43,1	10,5 Wo. nach Cortison +

gleiche Bild, wie es unter B an mit Cortison behandelten Tieren gewonnen wurde: Die Inseln waren sehr zahlreich und zum Teil überdurchschnittlich groß. Die B-Zellen waren relativ vermehrt, groß und weitgehend degranuliert. Degenerative Veränderungen wurden nicht gefunden.

D. Beobachtungen an einzelnen, mehrfach mit diabetogenen Noxen behandelten Tieren

Bei einigen Tieren wurden verschiedene oder auch gleiche diabetogene Noxen nacheinander verabreicht, um nach Möglichkeit auf diese doch noch einen bleibenden Diabetes zu erzeugen. Diese Versuche besitzen jedoch nur orientierenden Charakter, da die Tiere häufig infolge der durch die erste Noxe herabgesetzten allgemeinen Widerstandskraft kurze Zeit nach der Applikation der zweiten Noxe eingingen.

Nr. 320 erhielt etwa drei Monate nach der teilweisen Pankreatektomie 200 mg Alloxan/kg K. Gew. i.v. injiziert. Obwohl das Tier im Intervall normale Blutzucker hatte, ging es 24 Std nach der Injektion trotz Vorbehandlung mit Tocopherol und Nachbehandlung mit Glucose in der Hypoglykämie zugrunde. Der letzte Blutzuckerwert betrug 56 mg-%. Bei der Sektion wurde kein Pankreas mehr gefunden.

Nr. 325 erhielt ebenfalls in einem Abstand von fast drei Monaten zunächst 40 mg Dithizon/kg K. Gew. und dann 200 mg Alloxan/kg K. Gew. nach der üblichen Vorbehandlung i.v. verabreicht. Die Blutzucker blieben auch nach der zweiten Injektion innerhalb des normalen Schwankungsbereiches.

Nr. 345 erhielt mit 14 Tagen Abstand zweimal Alloxan, zunächst 150 und dann 200 mg/kg K. Gew. i.v. injiziert. Die Blutzucker blieben normal.

Nr. 774 erhielt innerhalb von 8 Tagen zweimal je 40 mg Dithizon/kg K. Gew. injiziert und ging entgegen dem sonstigen Verhalten der Tiere nach Applikation von Dithizon mit — wahrscheinlich hypoglykämischen — Krämpfen zugrunde.

Mehrere Tiere (Nr. 338, 318 und 316), die mit Dithizon vorbehandelt waren, und die später pankreatektomiert wurden, überlebten die Operation nur wenige Tage. Während dieser Zeit durchgeführte Blutzuckeruntersuchungen ergaben Werte, die im Normalbereich lagen.

Diskussion

In einer vorhergehenden Arbeit und in dieser Mitteilung wird über verschiedene Versuche berichtet, Meerschweinchen diabetisch zu machen. Dabei wurden ältere Untersuchungen bestätigt, nach denen dies weder mit Alloxan noch mit Cortison gelingt. Darüberhinaus konnte weder mit Dithizon noch mit Cortison bei teilpankreatektomierten Meerschweinchen ein bleibender Diabetes erzeugt werden. Das monoton refraktäre Verhalten dieser Species läßt sich nicht mit Faktoren erklären, die zur Deutung einer Alloxanresistenz vielleicht ausreichend wären. In der Literatur wurden bisher der hohe Blutspiegel an Glutathion, die besondere Topographie der Inselzellen und das Fehlen von histochemisch nachweisbarem Zink in den Inseln als Ursachen für die Alloxanresistenz diskutiert. Man muß viel eher annehmen, daß der physiologische Insulinbedarf der Meerschweinchen sehr viel niedriger ist als bei anderen Tierarten. Der wesentlich geringere Insulingehalt des Meerschweinchenpankreas (200 E Insulin im Kg Pankreas) läßt sich ebenfalls dahingehend deuten.

Tabelle 4. *Blutzucker und Körpergewicht bei mit Cortison behandelten pankreatektomierten Meerschweinchen*

Nr. Geschl.	K. Gew. g Gew. entf. Pank. mg (%)	Versuchsdauer	Tage														Gesamtdosis	Bemerkungen
			1	3	6	10	13	14	18	20	27	29	31	32	35	41	47	
786		tgl. Cortisondosis	25 →								50 →			25 →		50 →		BZ später normal
	550	K. Gew. g	442	464	490	492	530		546	540	560			556	568	550	530	1475	8 Wochen nach Cortison getöt.
♂	1200 (81%)	Blutzucker mg-%	99	96	108	98	148		116	97	236			147	104	129	122		K. Gew. 600 g
788		tgl. Cortisondosis	25 →								50 →			25 →		50 → +			Wird getötet, nachdem es dem
	542	K. Gew. g	462	462	474	458	500		498	506	540			566	558	494		1475	Tier schlecht geht
♂	900 (62%)	Blutzucker mg-%	125	96	103	96	121		102	107	115			172	121	124			
789		tgl. Cortisondosis	25 →								50 → +								
	485	K. Gew. g	456	448	472	448	490		475	496	480							850	Spontantod
♂	950 (73%)	Blutzucker mg-%	137	96	110	106	214		174	228	331								
795		tgl. Cortisondosis	25 → +																
	530	K. Gew. g	460	460	468	456	460											325	Spontantod
♂	780 (55%)	Blutzucker mg-%	90	103	100	124	114												
796		tgl. Cortisondosis	25 →								50 →			25 →		50 →			BZ später normal
	600	K. Gew. g	540	564	573	510	550		580	605	634			652	656	672	670	1475	8 Wochen nach Cortison getöt.
♂	900 (56%)	Blutzucker mg-%	114	137	96	115	100		275	152	182			292	139	88	123		K. Gew. 596 g
797		tgl. Cortisondosis	25 →								50 → +								
	505	K. Gew. g	490	472	460	442	425		440	424	376							750	Spontantod
♂	750 (55%)	Blutzucker mg-%	119	178	106	133	148		162	107	137								

Die histologischen Veränderungen während der Cortisonbehandlung lassen zunächst daran denken, daß die Anpassungsfähigkeit der Inseln an einen erhöhten Insulinbedarf größer ist als sie von anderen Tierarten her bekannt ist. In unseren Versuchen hatten jedoch auch Tiere mit ganz ausgeprägten histologischen Veränderungen, wie Vergrößerung und Neubildung von Inseln, normale oder nur gering erhöhte Blutzucker. Um vergleichbare Veränderungen mit Glucose allein an Katzen zu erzeugen, mußten Lukens u. Mitarb.[4] kontinuierliche Infusionen über einen Zeitraum von Wochen durchführen. Infolgedessen muß man als Stimulans neben dem Blutzucker die von Houssay[15] diskutierte Möglichkeit in Erwägung ziehen, daß das Wachstum der Inseln durch verschiedene Steroidverbindungen unmittelbar stimuliert wird.

Eine zufriedenstellende Erklärung dafür, daß Meerschweinchen keinen Diabetes bekommen, kann heute noch nicht gegeben werden. Man sollte deshalb die Ergebnisse von Stoffwechseluntersuchungen an Meerschweinchen nur mit Zurückhaltung verallgemeinern.

Zusammenfassung

1. Ergänzend zu einer vorhergehenden Mitteilung wurden weitere Versuche durchgeführt, um bei Meerschweinchen einen Diabetes zu erzeugen.

2. Nach der Entfernung von 52—81% des Gesamtpankreas wurde nur bei einem von 13 Tieren ein Blutzuckerwert über 200 mg-% beobachtet. Einzelne Glucosebelastungen ergaben auch keinen Anhaltspunkt für das Vorliegen eines latenten Diabetes.

3. Drei Gruppen von Meerschweinchen erhielten Cortison in unterschiedlich steigenden Dosen über eine Zeit von 5—20 Tagen injiziert. Vorübergehende Blutzuckersteigerungen wurden nur bei den mit höheren Cortisondosen behandelten Tieren frühestens nach 12—14 Tagen beobachtet. Der höchste Wert war 280 mg-%. Später als 8 Tage nach der letzten Cortisoninjektion wurden keine erhöhten Blutzucker mehr gefunden.

Bei der histologischen und histometrischen Untersuchung des Pankreas dieser Tiere wurde eine Zunahme der Inselzahl und Fläche mit einer Vermehrung kleinster Inseln und dem Vorkommen sehr großer Inseln festgestellt. Außerdem war der prozentuale Anteil der B-Zellen deutlich vermehrt.

4. Auch bei einer kleinen Gruppe teilpankreatektomierter Tiere konnte durch eine 2—6wöchige Behandlung mit täglich 25 bzw. 50 mg Cortison kein bleibender Diabetes erzeugt werden. Nur bei der Hälfte der Tiere wurden vorübergehende Blutzuckerwerte bis zu 331 mg-% beobachtet.

5. Die Beobachtung, daß sich Meerschweinchen gegenüber diabetogenen Noxen mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus einheitlich refraktär verhalten, kann bisher nicht erklärt werden.

Die Arbeit wurde durch die Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Anmerkung bei der Korrektur. Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit diskutierten Problemen über das besondere Verhalten des Meerschweinchens erscheint eine in der Zwischenzeit erschienene Arbeit von L. Goldsmith und P. J. Moloney interessant: Chromatographie of guinea pig native insulin (Biochem. J. **66**, 432, 1957). Die Verfasser fanden, daß sich das Insulin der Meerschweinchen sowohl papierchromatographisch als auch durch Insulinantikörper von den Insulinen anderer Tierarten deutlich unterscheidet.

Literatur

[1] Abelore, W. A., and K. E. Paschkis: Endocrinology (Springfield, Ill.) **55**, 637 (1954). — [2] Bencosme, S. A., and S. S. Lazarus: A. M. A. Arch. Path. **62**, 285 (1956). — [3] Brady, R. O., F. D. W. Lukens and S. Gurin: J. of Biol. Chem. **193**, 459 (1951). — [4] Brown, E. M., F. C. Dohen, L. R. Freedman, P. de Moor and F. D. W. Lukens: Endocrinology (Springfield, Ill.) **50**, 644 (1952). — [5] Colowick, S. P., G. T. Cori and M. W. Slein: J. of Biol. Chem. **168**, 583 (1947). — [6] Conn, J. W., L. H. Louis and C. E. Wheeler: J. Labor. a. Clin. Med. **33**, 651 (1948). — [7] Conn, J. W., L. H. Louis and M. W. Johnson: Science (Langcaster, Pa.) **109**, 279 (1949). — [8] Fabrini, A.: Folia Endocrinologica **9**, 95 (1956). — [9] Folley, S. J. and Frech: Biochemic. J. **45**, 117 (1949); **46**, 465 (1950). — [10] Franckson, J. R. M., W. Gepts, P. A. Bastenie, V. Conard, N. Cordier u. L. Kovacs: Acta endocrinol. (Copenh.) **14**, 153 (1953). — [11] Gomori, G.: Amer. J. Path. **15**, 497 (1939). — [12] Hausberger, F. X., and A. J. Ramsay: Endocrinology (Springfield, Ill.) **53**, 423 (1953). — [13] Hausberger, F. X., and B. C. Hausberger: Amer. J. Physiol. **183**, 302 (1955). — [14] Houssay, B. A., R. R. Rodriguez and A. F. Cardeza: Endocrinology (Springfield, Ill.) **54**, 550 (1954). — [15] Houssay, B.A.: Newer Concepts of the Causes and Treatment of Diabetes Mellitus (Symposium of the N. Y. Diab. Assoc. 1953). The Nat. Vit. Foundation, Inc. N. Y., 1954. — [16] Ingle, D. J.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **29**, 649 (1941). — [17] Ingle, D. J., R. Sheppard, J. S. Evans and M. H. Kuizenga: Endocrinology (Springfield, Ill.) **37**, 341 (1945). — [18] Kass, E. H., S. H. Ingbar and M. Finland: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 669 (1950). — [19] Lazarus, S. S., and S. A. Bencosme: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **89**, 114 (1955). — [20] Long, C. N. H.: Influence of the Adrenal Cortex on Carbohydrate Metabolism. Ciba Foundation Colloquia of Endocrinology, Vol VI, Little, Brown A. C. 1953. — [21] Maske, H.: Klin. Wschr. **1955**, 1058. — [22] Maske, H., u. K. Weinges: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 406 (1957). — [23] McIntosh, H. W., H. T. McAlpine, B. Singer and M. M. Hoffmann: Proc. First Clin. ACTH Conf., J. R. Mote ed., S. 14—24. Philadelphia: Blakiston Co. 1950. — [24] Riviere, M., et C. Combescat: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 93 (1954). — [25] Salter, J., and Ch. H. Best: Brit. Med. J. II, **1953**, 353. — [26] Welt, I. D., and A. E. Wilhelmi: Yale, J. Biol. Chem. **23**, 99 (1950).

Dr. Kurt Weinges, II. Med. Klinik der Univ. München 15, Ziemßenstr. 1a

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 455—463 (1957)

Aus der II. Medizinischen Univ.-Klinik und Poliklinik der Charité, Berlin
(Direktor: Professor Dr. med. A. Krautwald)

Verlauf und histologische Veränderungen der experimentellen Nephritis bei Ratten unter Einwirkung von Sulfapyridin und Sulfadimethylpyrimidin

Von
A. Krautwald, H. Dutz und K. Voigt

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Juni 1957)

Chemotherapeutica werden ihrer Bedeutung zur Behandlung bakteriell bedingter Entzündungen gemäß auch bei Infektionen des Urogenitaltraktes häufig angewendet. Welchen Einfluß dabei das jeweils verwendete Chemotherapeuticum auf das allergisch-entzündlich veränderte Nierenparenchym ausübt, ist für die einzelnen Substanzen keineswegs geklärt. Dessen ungeachtet werden z.B. Sulfonamide häufig auch bei einer Pyelitis routinemäßig verordnet, ohne daß eine entzündliche Mitbeteiligung des Nierenparenchyms ausgeschlossen wurde. Es interessierte uns, welches Chemotherapeuticum bei einer bakteriell bedingten Pyelitis und einer gleichzeitig bestehenden entzündlichen Nierenerkrankung die geringsten zusätzlichen Schädigungen auf die Nephritis ausübt.

Wir sahen uns daher veranlaßt, die Wirkung einiger Chemotherapeutica auf eine im Experiment an größeren Versuchsreihen gut reproduzierbare allergisch-entzündliche Rattennephritis und auf normale Rattennieren zu überprüfen. Für den experimentellen Nachweis der Wirkungen dieser Stoffe auf Nierenparenchymschäden erscheint uns die Nephritis-Nephrose nach Masugi deswegen besonders geeignet, weil bei ihr eine ziemlich gleichmäßige Schädigung sowohl des glomerulären und tubulären Apparates als auch des Interstitiums vorliegt.

Die vorstehende Mitteilung befaßt sich mit der Einwirkung eines schwerer löslichen Sulfonamids, des Sulfapyridins (Eubasin) und eines leichter löslichen Sulfonamids, des Sulfadimethylpyrimidins (Diazil) auf die experimentelle Nephritis und auf Nieren sonst unbehandelter Ratten. Es sollte geklärt werden, ob diese Nierenparenchymschäden in Abhängigkeit von Präparat und Dosierung günstig oder ungünstig beeinflußt werden und inwieweit sich bei normalen Nieren Veränderungen erkennen lassen.

Methodik

Die experimentelle Nephritis wurde durch i.v. Gabe von nephrotoxischem Serum, das von Kaninchen gewonnen wurde, die mit Rattennierenbrei sensibilisiert waren, nach den Angaben von Masugi erzeugt. Die Ratten erhielten je 1 ml Nephrotoxin an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in die Schwanzvene. Sie bekamen während des Versuchsverlaufes ein 0,5% NaCl enthaltendes Mischfutter sowie Wasser ad libitum. Gewicht, Blutdruck, Allgemeinverhalten der Tiere sowie Harnbefunde hinsichtlich Eiweiß und Sediment wurden in regelmäßigen Abständen im Versuchsverlauf kontrolliert. Zum Abschluß des Versuches wurden die Tiere dekapitiert und die Nieren histologisch nach Anwendung der HE- und Sudanfärbung ausgewertet. Dabei wurden glomeruläre Veränderungen, degenerative tubuläre Veränderungen, tubuläre Erweiterungen, interstitielle Veränderungen besonders hinsichtlich des Auftretens von Rundzelleninfiltraten und der Grad der Verfettung bewertet. Als Kriterium für den Schweregrad der Veränderungen wurden in jedem Schnitt 50 Glomerula und eine entsprechende Anzahl von Tubuli ausgezählt und bewertet, wobei ein Befallensein bis zu 15 Glomerula im Sinne einer Glomerulitis als leicht (I), bis 30 Glomerula als mittelschwer (II) und über 30 als schwer (III) bewertet wurde. In analoger Weise werden die tubulären degenerativen Veränderungen und Erweiterungen sowie die Verfettungen bewertet. Der Schweregrad I schließt jeweils Veränderungen ein, wie sie auch bei Normaltieren spontan auftreten können.

Neben den therapeutischen Nephritisserien liefen jeweils mit dem gleichen nephrotoxischen Serum behandelte Kontrollserien, die kein Medikament erhalten hatten, sowie Kontrollserien von Normaltieren, die nur mit dem Medikament behandelt wurden.

Es wurden zum Teil verschieden hohe Dosierungen der Sulfonamide in ihrer Wirkung ausgetestet, zum Teil wurden auch die Einwirkungen gleichhoher Sulfonamiddosen auf Nephritiden mit unterschiedlichen Schweregraden untersucht. Die Applikation der Sulfonamide erfolgte grundsätzlich intraperitoneal.

Im einzelnen setzten wir für die Sulfonamidversuche vier Versuchsgruppen mit therapeutischen und entsprechenden Kontrollserien an.

Gruppe A. Eubasin (in einer Dosierung von 0,2 g/kg/die) sowie Diazil (in einer Dosierung von 0,5 g/kg/die) bei mittelschwerer Nephritis mit entsprechenden Kontrollserien. Serie I (17 Tiere): Eubasin (0,2 g/kg/die) + Nephrotoxin (je 1 cm^3 am 4. und 5. Versuchstag). Tötung der Tiere am 16. Versuchstag. Serie II (15 Tiere): Diazil (0,5 g/kg/die) + Nephrotoxin wie bei Serie I. Serie III (15 Tiere): Nephrotoxin (wie bei Serie I), unbehandelte Nephritis-Kontrollserie. Serie IV (13 Tiere): Eubasin (Dosis wie bei Serie I) bei Normaltieren. Serie V (15 Tiere): Diazil (Dosis wie bei Serie II) bei Normaltieren.

Gruppe B. Eubasin und Diazil (in einer Dosierung von je 0,3 g/kg/die) bei mittelschwerer Nephritis und unbehandelte Nephritis-Kontrollserie. Serie I (30 Tiere): Eubasin (0,3 g/kg/die) + Nephrotoxin (je 1 cm^3 am 4. und 5. Versuchstag), Tötung am 26. Versuchstag. Serie II (30 Tiere): Diazil (0,3 g/kg/die) + Nephrotoxin wie bei Serie I. Serie III (30 Tiere): Nephrotoxin, unbehandelte Nephritis-Kontrollserie.

Gruppe C. Diazil (in einer Dosierung von 0,12 g/kg/die) bei leichter Nephritis und entsprechende Kontrollserien. Serie I (30 Tiere): Diazil (0,12 g/kg/die) vom 3. Versuchstag an, Nephrotoxin (je 1 cm^3 am 1. und 2. Versuchstag), Tötung am 21. Tag. Serie II (20 Tiere): Nephrotoxin wie bei Serie I, unbehandelte Nephritis-Kontrollserie. Serie III (20 Tiere): Diazil (0,12 g/kg/die) bei Normaltieren.

Gruppe D. Diazil (in gleicher Dosierung wie Gruppe C) bei mittelschwerer Nephritis. Serie I (30 Tiere): Diazil und Nephrotoxin wie C I. Serie II (30 Tiere): Nephrotoxin (2 $\times$ 1 cm^3 i. v.), unbehandelte Nephritis-Kontrollserie.

Ausführlichere Angaben über die angewandte Methodik, Blutdruckmessung usw. und detailliertere Angaben der einzelnen Versuchsergebnisse sind aus den Dissertationsschriften Möwius, Berlin 1955, Kriedemann, Berlin 1955 und Strangfeld, Berlin 1957 zu ersehen.

Ergebnisse

1. Versuchsverlauf. Die Beurteilung der Tiere während des Versuches ergab bei den einzelnen Gruppen:

Das klinische Verhalten der Tiere, ihre Freßlust, das Aussehen des Felles zeigten bei den Nephritis-Tieren keine sicheren Unterschiede zwischen den mit Sulfonamid behandelten und den unbehandelten Tieren. Die Harnbefunde boten gleichfalls hinsichtlich der Proteinurie und der Sedimentbefunde keine verwertbaren Differenzen. Es waren bei den Nephritis-Tieren, bis auf die leichte Verlaufsform (Gruppe C), deutliche Eiweißausscheidung sowie im Sediment Erythrocyten, Leukocyten und teilweise auch Cylinder nachweisbar. Bei den Gruppen A und B fanden sich sowohl bei der Eubasin- als auch bei der Diazil-Serie reichlich Sulfonamidkristalle im Harn.

Die Blutdruckwerte wurden in Gruppe A durch Eubasin- und Diazilwirkung bei den Nephritis-Tieren im Vergleich zu den Nephritis-Kontrollserien nicht wesentlich beeinflußt. Bei der Eubasin-Nephritisserie lagen sie im Mittel um 10 mm Hg höher als bei der Nephritis-Vergleichsserie.

In Gruppe B ergaben sich deutliche Unterschiede in der Blutdruckhöhe zwischen der Eubasinserie einerseits und der Diazil- und Vergleichsserie andererseits. Die mittleren Blutdruckwerte der Eubasinserie lagen hier um 20 mm Hg über den beiden anderen Serien.

Die nur mit Sulfonamid behandelten Tiere zeigten in ihrem Verhalten keine sichere Abweichung von der Norm. Fast sämtliche Tiere der Gruppe A IV und V boten eine geringe Proteinurie sowie im Sediment reichlich Sulfonamidkristalle. Bei den mit Diazil behandelten Normaltieren der Gruppe C (niedrige Dosierung) waren dagegen weder Eiweißausscheidung noch Sulfonamidkristalle im Harn nachweisbar. Die Mortalität in den beiden Serien geht aus Tab. 1 und Abb. 1—4 hervor. Hier sind jedoch die im direkten Anschluß an die Nephrotoxin-Injektion entstandenen, zahlenmäßig geringen Schocktodesfälle nicht berücksichtigt. Es fiel allerdings auf, daß ihre Zahl bei den mit Eubasin vorbehandelten Tieren der Gruppe A und B höher lag als bei den Vergleichsserien.

2. Histologische Befunde. Die histologischen Veränderungen werden in Tab. 1 nach Versuchsgruppen getrennt, unter Aufzeichnung nach Schweregraden, zahlenmäßig wiedergegeben. Zur besseren Übersicht werden die histologischen Veränderungen der einzelnen Gruppen auch graphisch hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Schweregrade in Abb. 1—4 dargestellt.

Die histologischen Ergebnisse der Gruppe A zeigen, daß unter der Dosierung von 0,2 g Eubasin/kg/die und von 0,5 g Diazil/kg/die keine statistisch sicheren Unterschiede in bezug auf die glomerulären Veränderungen zu verzeichnen sind. Dagegen liegen stärkere tubuläre Degenerationen und Verfettungen im Vergleich zu den Kontrollserien vor. Es fällt ferner auf, daß sowohl bei den Eubasin- als auch bei den Diazil-Tieren mittelschwere und schwere tubuläre Erweiterungen bei einer Reihe von Tieren vorliegen, während sie bei den Nephritis-Kontrolltieren in dieser Form fehlen.

Tabelle 1. *Zahlenmäßige Zusammenstellung der histologischen Befunde der einzelnen Versuchsserien unter Zugrundelegung von 3 Schweregraden* (I = leicht, II = mittelschwer, III = schwer), vgl. auch Methodik

Gruppe Nr.	Gesamtzahl	Zahl d. auswertb. Tiere	Glomerula			Tubuli			tubul. Erw.			Verfettung			Tod im Vers.
			I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
A I	17	9	0	8	1	3	4	2	3	1	2	2	7	0	2
A II	15	8	1	4	3	4	3	1	3	2	1	4	4	0	
A III	15	12	1	9	2	6	3	0	4	0	0	6	6	0	
A IV	13	13	10	1	2	6	3	0	7	0	0	12	1	0	
A V	15	15	10	0	0	6	0	0	3	0	0	11	4	0	
B I	30	19	0	12	7	2	8	9	5	5	8	4	9	6	
B II	30	24	2	13	9	1	17	6	4	12	4	3	16	5	
B III	30	20	1	13	6	10	10	0	1	1	0	8	11	1	
C I	30	20	14	6	0	11	9	0	13	3	0	18	2	0	
C II	20	13	7	6	0	5	8	0	4	1	0	8	5	0	1
C III	20	19	7	0	0	9	0	0	4	0	0	13	6	0	
D I	30	26	0	17	9	1	16	9	6	16	4	10	14	2	1
D II	30	28	1	14	13	11	16	1	19	6	0	10	16	2	

Makroskopisch fanden sich bei fast allen mit Eubasin behandelten Tieren kleine Kristallbildungen im Bereich der Harnwege, während sie bei den Diazil-Tieren nur in zwei Fällen nachweisbar waren.

Bei den Tieren der Gruppe B, bei der die gleiche Eubasin- und Diazil-Dosis von je 0,3 g/kg/die angewandt wurde, fanden sich ebenfalls keine Unterschiede in der Ausprägung der glomerulären Veränderungen im Vergleich zur Nephritis-Kontrollserie. Die tubulären degenerativen Veränderungen und Erweiterungen II. und III. Grades sind auch hier bei den Sulfonamid-Tieren wiederum stärker ausgeprägt als bei denen der Kontrollserie, in geringerem Maße auch die Verfettungen, wobei sich in bezug auf die tubulären Erweiterungen eine statistische Signifikanz ergibt. In der Schwere dieser Veränderungen fanden sich keine Unterschiede zwischen der Eubasin- und Diazil-Serie, obwohl auch hier das Eubasin bei einer größeren Zahl von Tieren zu kleineren Kristallbildungen in den harnableitenden Wegen geführt hatte, während Diazilausfällungen

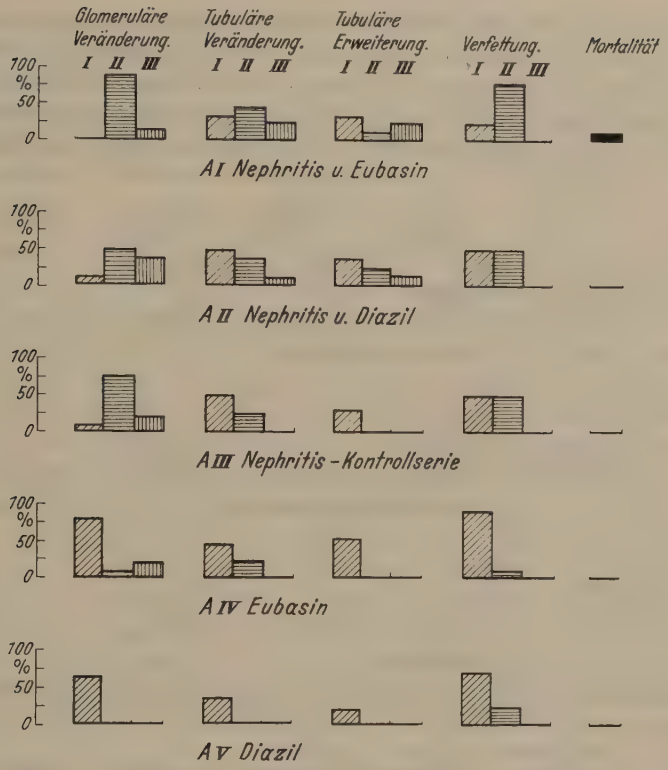


Abb. 1. Graphische Darstellung der histologischen Veränderungen unter prozentualer Aufgliederung nach Schweregraden bei den Versuchsserien der Gruppe A (*I* leicht, *II* mittelschwer, *III* schwer)

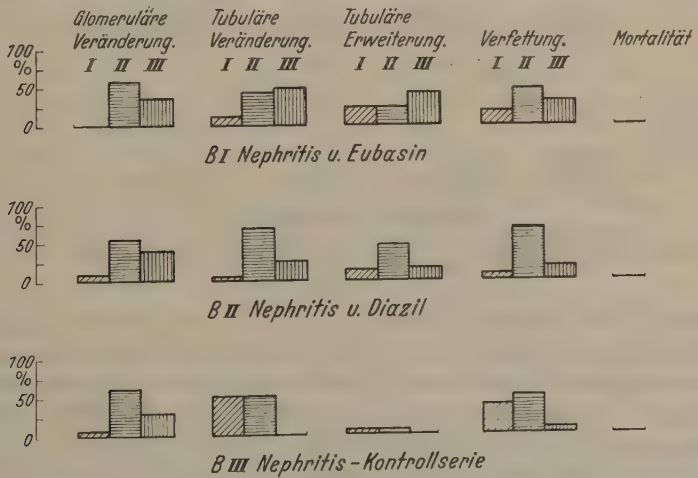


Abb. 2. Graphische Darstellung der histologischen Veränderungen unter prozentualer Aufgliederung nach Schweregraden bei den Versuchsserien der Gruppe B

nicht beobachtet wurden. Die interstitiellen Veränderungen hinsichtlich Zellvermehrung und Ödem waren bei den Sulfonamid-Tieren in beiden Gruppen stärker ausgeprägt als bei der Nephritis-Kontrollserie.

In den Gruppen C und D schließlich wurde eine geringe Diazildosierung (0,12 g/kg/die) angewandt, die einer beim Menschen üblichen Dosierung

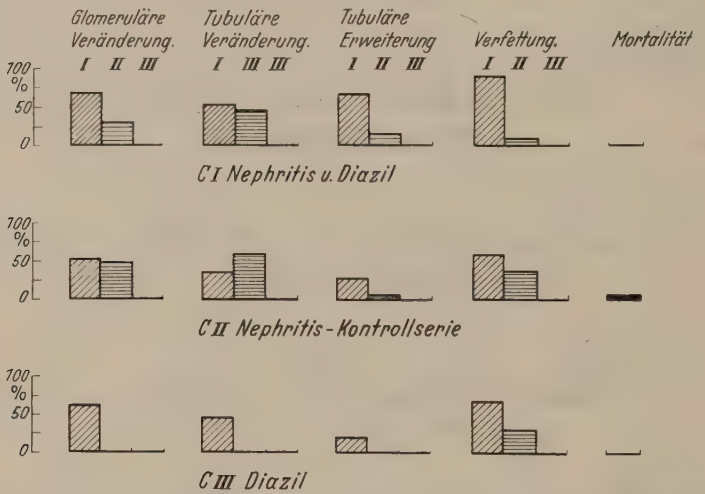


Abb. 3. Graphische Darstellung der histologischen Veränderungen unter prozentualer Aufgliederung nach Schweregraden bei den Versuchsserien der Gruppe C

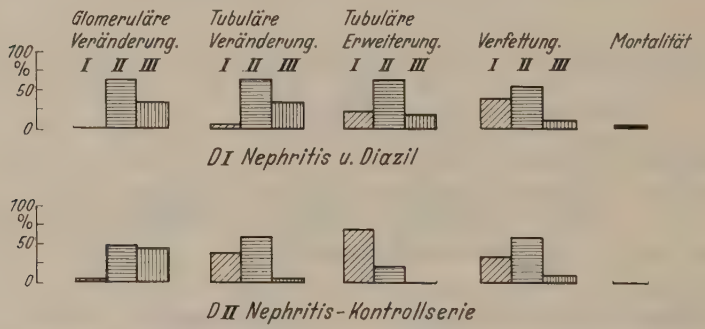


Abb. 4. Graphische Darstellung der histologischen Veränderungen unter prozentualer Aufgliederung nach Schweregraden bei den Versuchsserien der Gruppe D

entspricht. Die Wirkung dieser Dosis auf eine leichte Nephritis (Gruppe C) und eine mittelschwere Nephritis (Gruppe D) zeigte, wie in der vorangegangenen Gruppe, keine Beeinflussung der glomerulären Veränderungen. Dagegen traten trotz der niedrigen Diazil-Dosierung bei mittelschwerer Nephritis (Gruppe D) die gleichen stärkeren tubulären degenerativen Veränderungen und Erweiterungen wie bei den Tieren der Gruppen A und B auf, während bei der leichten Nephritis diese

zusätzlichen tubulären Schädigungen nicht nachweisbar waren. Die Veränderungen in Gruppe D lassen sich statistisch mit einer über 95%igen Wahrscheinlichkeit sichern[1].

Zahlreiche der nur mit Sulfonamid behandelten Normaltiere wiesen Veränderungen im Sinne einer Glomerulonephrose und geringe degenerative tubuläre Schädigungen einschließlich Verfettungen auf.

Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen, daß trotz verschieden guter Löslichkeit sowohl von Eubasin als auch von Diazil bei diffusen allergisch-entzündlichen Veränderungen im Nierenparenchym bei gleicher Dosierung (0,3 g/kg/die) zusätzliche degenerative Tubulusveränderungen und Erweiterungen sowie vermehrte interstitielle entzündliche Erscheinungen ausgelöst werden. Diese Wirkungen, die ziemlich gleichmäßig bei der überwiedenden Zahl der Versuchstiere nachweisbar waren, möchten wir als chemisch-toxische Schäden deuten, denen gegenüber das durch die experimentelle Nephritis vorgeschädigte Nierenparenchym anfälliger ist als das von Normaltieren. Auch die Anwendung kleinerer Diazildosen (0,12 g/kg/die) bedingt bei mittelschwerer Nephritis die gleichen Veränderungen, während eine leichtere entzündliche Vorschädigung (Gruppe C) nicht zu zusätzlichen Tubulusschäden Anlaß gibt. Eine leichte nephrotoxische Schädigung durch Eubasin und Diazil läßt sich auch bei Normaltieren nachweisen, die hier vorliegenden Veränderungen möchten wir im Sinne einer Glomerulonephrose (nach Randerath) auffassen, sie können nach Lüders auch als seröse Glomerulitis gedeutet werden. Stärkere tubuläre und interstitielle Veränderungen waren bei den Normaltieren nicht nachweisbar.

In der klinischen Literatur liegen zahlreiche Beobachtungen über Nierenschäden durch Sulfonamide vor. Es kam in der Anfangszeit der Sulfonamid-Ära bei Anwendung schwerer löslicher Sulfonamide des öfteren zu schweren Nierenschäden einschließlich Kristallausfällungen in den ableitenden Harnwegen (Zusammenstellung bei Höfer, ferner bei Bükert). Neben der obstruierenden Wirkung durch Kristallausfällungen der Sulfonamide wird jedoch besonders von pathologischer Seite (Letterer, Lüders) auf die Möglichkeit allergisch-entzündlicher und chemisch-toxischer Schäden hingewiesen. Eine eingehende Diskussion der Sulfonamidschäden an den Nieren von pathologischer Seite findet sich in der Monographie von Allen. Der Autor unterscheidet auf Grund eines großen pathologischen Materials akute

[1] Herrn Prof. Dr. med. Bienengräber, Prosektor des Pathologischen Instituts der Humboldt-Universität, Berlin (Direktor: Prof. Dr. med. Kettler) und Herrn Dr. med. Lüders, Chefarzt des Pathologischen Instituts des Krankenhauses Berlin-Tempelhof, möchten wir an dieser Stelle für die liebenswürdige Beratung bei der histologischen Auswertung danken.

Ferner danken wir Herrn Dr. E. Schindowski, Dipl.-Math. an dem Forschungsinstitut für angewandte Mathematik der Akademie der Wissenschaften, Berlin (Direktor: Prof. Dr. K. Schröder) für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

umschriebene oder diffuse interstitielle Infiltrate, akute umschriebene oder diffuse Glomerulonephritiden, hämoglobinurische und nekrotisierende Nephrosen, nekrotisierende Arteriitiden sowie schließlich Obstruktionen durch Auskristallisation von Sulfonamiden. Er beschreibt auch das Vorkommen von Tubuluserweiterungen in seinem Material, wobei er für das Zustandekommen der Erweiterungen nicht so sehr mechanische Tubulusobstruktionen durch Ausfällungen als vielmehr entzündlich-toxische Schäden am Nierenparenchym mit ihren Folgen für Hämodynamik und Funktion verantwortlich macht. In unserem Zusammenhang ist seine abschließende Stellungnahme von Bedeutung, in der zum Ausdruck gebracht wird, daß weder die Sulfonamiddosis noch die Kristallbildung in den Nieren mit der Schwere der Parenchymveränderungen in einem konstanten Verhältnis stehen.

Die Ergebnisse unserer experimentellen Untersuchungen können diese am klinischen Material gewonnenen Feststellungen des Pathologen vollauf bestätigen. Tubuläre Erweiterungen finden sich bei unseren Ratten sowohl bei Anwendung leicht löslicher Sulfonamide (Diazil) ohne nachweisbare Auskristallisierung als auch bei Gabe schwerer löslicher Sulfonamide (Eubasin) mit Kristallbildungen in gleicher Stärke. Diese Tubulusveränderungen sind auch bei Anwendung geringerer Dosen (0,12 g/kg/die) nachweisbar. Voraussetzung für ihr Auftreten ist jedoch eine diffuse entzündliche Vorschädigung des Nierenparenchyms im Sinne einer zumindest mittelschweren experimentellen Nephritis-Nephrose. Bei nur leichten entzündlichen Schäden ist eine zusätzliche toxische Schädigung nicht nachweisbar.

Die diffuse gleichmäßige Verteilung der Tubulusschäden, das Fehlen ausgesprochener allergischer Erscheinungen im Nierenparenchym im Sinne einer nekrotisierenden Arteriitis, ebenso das Fehlen allergisch-entzündlicher interstitieller umschriebener Infiltrate und glomerulärer Schäden stärkeren Ausmaßes machen eine chemisch-toxische Wirkung der Sulfonamide wahrscheinlicher als eine allergische, die auf dem Boden einer Sensibilisierung entstanden ist.

Moeschlin u. Steiner sahen bei Mäusen und Kaninchen unter hoher Dosierung von Sulfadimethylpyrimidin und Sulfapyridin keine Nierenschädigungen. Antopol u. Robinson sowie Thaddea u. Zoloff fanden bei experimentellen Untersuchungen nach längerer Applikation von Sulfapyrimidin Sulfonamidsteinbildungen in den ableitenden Harnwegen. Brunson u. Edwards weisen auf Grund von Untersuchungen an Albinoratten auf tubuläre toxische Wirkungen im Sinne einer fettigen Degeneration hin. Bütikofer zeigte im Tierexperiment (Ratte) das unterschiedliche Verhalten verschiedener Sulfonamide hinsichtlich Auskristallisation in den Harnwegen in Abhängigkeit vom p_H und der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge.

Für die Klinik ergeben unsere Untersuchungen, daß bei vorgeschädigtem Nierenparenchym, wie es in diffuser oder umschriebener Form vor allem bei Pyelonephritiden, aber auch bei infektiös-toxischen allgemeinen Erkrankungen vorkommt, Sulfonamide auch in leicht löslicher Form und in therapeutisch üblichen Dosen zusätzliche chemisch-toxische Schädigungen hervorzurufen in der Lage sind. Unabhängig davon können weiterhin allergisch-entzündliche Erscheinungen bei Überempfindlichkeit gegen Sulfonamide vorkommen.

Zusammenfassung

An 13 Rattenserien mit insgesamt 295 Tieren wird die Wirkung eines leicht löslichen Sulfonamids, des Sulfadimethylpyrimidins (Diazil) und eines schwerer löslichen Sulfonamids, des Sulfapyridins (Eubasin) auf den klinischen Verlauf einer experimentellen Nephritis-Nephrose nach Masugi und die hierbei auftretenden histologischen Nierenveränderungen sowie die Wirkung der Sulfonamide auf Nieren von Normaltieren studiert.

Bei Vorliegen einer mittelschweren Nephritis kommt es sowohl bei Diazil als auch bei Eubasin unter verschieden hoher Dosierung gleichmäßig zu zusätzlichen chemisch-toxischen tubulären Schäden mit tubulären Erweiterungen, unabhängig von dem Auftreten von Kristallausfällungen.

Im klinischen Ablauf finden sich bis auf eine höhere Blutdrucklage bei einer Eubasin-Nephritisserie keine wesentlichen Differenzen während einer Versuchsdauer von 21 Tagen zwischen den Sulfonamidserien und den unbehandelten Nephritiskontrolltieren.

Bei einer leichten Nephritis-Nephrose bewirkt Diazil in geringerer Dosierung keine zusätzlichen Schäden. An Nieren von Normaltieren lassen sich unter Sulfonamid-Einwirkung glomerulonephrotische Veränderungen und geringe tubuläre Schäden feststellen.

Die klinische Anwendung auch leichter löslicher Sulfonamid-Präparate wird auf Grund der experimentellen Ergebnisse bei bestehender Vorschädigung des Nierenparenchyms widerraten.

Literatur

Allen, A. C.: The Kidney. New York: Grune & Stratton 1951. — Antopol, W., and H. Robinson: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **40**, 428 (1939). — Brunson, J. G., and J. G. Edwards: Amer. J. Path. **26**, 923 (1950). — Bükert, A.: Münchn. med. Wschr. **1955**, 1528. — Bütikofer, P.: Praxis **34**, 1 (1945). — Höfer, W.: Z. ärztl. Fortbild. **47**, 575 (1953). — Letterer, E.: Medizinische **1956**, 1331. — Lüders, C. J.: Z. inn. Med. **4**, 212 (1949). — Masugi, M.: Beitr. path. Anat. **91**, 82 (1933); **92**, 492 (1934). — Klin. Wschr. **1935**, 373. — Moeschlin, S., u. E. Steiner: Schweiz. med. Wschr. **1944**, 928. — Randerath, K.: in E. Becher: Nierenkrankheiten 2. Bd., Jena: Verlag Fischer 1947. — Thaddea, S., u. R. Zoloff: Arch. exper. Path. und Pharmakol. **202**, 249 (1943).

Professor Dr. A. Krautwald,
II. Med. Universitäts-Klinik u. Poliklinik der Charité, Berlin N 4, Schaumannstr. 21

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 464—472 (1957)

Aus der II. Medizinischen Univ.-Klinik u. Poliklinik der Charité, Berlin
(Direktor: Professor Dr. med. A. Krautwald)

Verlauf und histologische Nierenveränderungen bei der experimentellen Nephritis unter Einwirkung von Penicillin, Terramycin und Streptomycin

Von
A. Krautwald, H. Dutz und K. Voigt

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Juni 1957)

Nachdem in der vorangehenden Arbeit von uns die Wirkung von Sulfonamiden verschiedener Löslichkeit auf entzündlich geschädigtes und normales Nierengewebe dargestellt wurde, sollen die folgenden Untersuchungen mögliche Veränderungen durch die Anwendung einer Reihe von Antibiotica klarstellen unter Zugrundelegung der gleichen Versuchsanordnung. Systematische Untersuchungen unter Benutzung der experimentellen Nephritis als Krankheitsmodell zu dieser Problematik liegen bisher nicht vor. Nephrotoxische Wirkungen durch Antibiotica auf gesundes Nierengewebe werden nur vereinzelt berichtet, so in bezug auf das Oxytetracyclin von Sedwitz u. Mitarb., in bezug auf das Streptomycin von Molitor.

Methodik

Es wurde nach dem bereits in der vorigen Arbeit beschriebenen Verfahren eine experimentelle Nephritis bei Ratten erzeugt. Der klinische Verlauf und die histologischen Nierenveränderungen wurden untersucht, die histologische Auswertung erfolgte nach den gleichen Gesichtspunkten. Im einzelnen wurden die nachfolgenden Serien angesetzt:

Gruppe A. Depot-Penicillin in einer Dosis von 20000 E/kg/die bei einer mittelschweren Nephritis. Serie I (30 Tiere): Nephrotoxin am 1. und 2. Versuchstag, ab 3. Versuchstag 20000 E/kg/die wäßriges Depot-Penicillin (Arzneimittelwerk Dresden) i.m., Tötung der Tiere am 21. Versuchstag. Serie II (30 Tiere): Nephrotoxin wie A I, unbehandelte Nephritis-Kontrollserie. Serie III (20 Tiere): Penicillin (Dosierung wie A I) bei Normaltieren.

Gruppe B. Terramycin in einer Dosis von 40 mg/kg/die bei einer leichten Nephritis. Serie I (30 Tiere): Nephrotoxin am 1. und 2. Versuchstag, ab 3. Versuchstag 40 mg/kg/die Terramycin (Lederle) i.p., Tötung der Tiere am 21. Versuchstag.

Die Versuchsprotokolle sind im einzelnen in Inaugural-Dissertationen von Jaensch, Berlin 1956, Landmann, Berlin 1957, und Dittert, Berlin 1957, niedergelegt.

Serie II (20 Tiere): Nephrotoxin wie bei B I, unbehandelte Nephritis-Kontrollserie (gleiche Kontrollserie wie C II in der vorangehenden Mitteilung). Serie III (20 Tiere): Terramycin wie unter B I bei Normaltieren.

Gruppe C. Streptomycin in einer Dosis von 25 mg/kg/die bei einer schweren Nephritis. Serie I (29 Tiere): Nephrotoxin je 1 cm^3 am 1. und 2. Versuchstag, ab 3. Versuchstag 25 mg/kg/die Streptomycin (Jenapharm) i. m., Tötung der Tiere am 21. Versuchstag. Serie II (29 Tiere): Nephrotoxin wie bei C I, unbehandelte Kontrollserie. Serie III (15 Tiere): Streptomycin wie bei C 1 bei Normaltieren.

Ergebnisse

1. Versuchsverlauf. Wir kamen im einzelnen zu den nachfolgenden, für die Beurteilung der medikamentösen Einwirkungen relevanten Feststellungen, wobei grundsätzlich beachtet werden muß, daß die Schwere der Nephritis in den einzelnen Gruppen infolge unterschiedlicher Stärke des angewandten Nephrotoxins variiert, aber innerhalb der Gruppen gleich ist.

Das allgemeine Verhalten der Tiere war in Gruppe A und B zwischen behandelten und unbehandelten Tieren nicht unterschiedlich, es war im

Tabelle 1. *Zahlenmäßige Zusammenstellung der histologischen Befunde der einzelnen Versuchsserien unter Zugrundelegung von 3 Schweregraden* (I = leicht, II = mittelschwer, III = schwer), vgl. auch Methodik

Gruppe Nr.	Gesamtzahl	Zahl d. auswertb. Tiere	Glomerula			Tubuli			tubul. Erw.			Verfettung			Tod im Vers.
			I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
A I	30	29	13	14	2	25	4	0	27	2	0	17	11	1	0
A II	30	29	8	18	3	20	9	0	24	5	0	18	10	1	1
A III	20	20	10	10	0	19	1	0	20	0	0	16	3	1	0
B I	30	26	16	10	0	1	23	2	9	12	5	1	10	15	0
B II	20	13	7	6	0	5	8	0	4	1	0	8	5	0	1
B III	20	18	1	15	2	0	14	4	4	7	7	1	11	6	2
C I	29	26	0	0	26	0	11	15	10	14	2	1	1	24	14
C II	29	27	0	0	27	0	5	22	9	11	5	1	9	17	23
C III	15	15	6	1	1	6	3	0	0	0	0	15	0	0	0

ganzen nicht stark beeinträchtigt. In der Gruppe C dagegen, die in den unbehandelten Vergleichsserien ein sehr schweres klinisches Krankheitsbild zum Teil mit massiven Ödemen, Ascites, Durchfällen und mangelnder Freßlust bot, zeigten die mit Streptomycin behandelten Tiere einen wesentlich günstigeren Allgemeinzustand. Obwohl bei ihnen die Ausprägung der Ödeme gleich stark war, kam es jedoch nicht zu so starkem Durchfall und Gewichtsverlust wie bei den unbehandelten Tieren (Nephritis-Kontrolltiere), sie waren munterer, gepflegter und fraßen besser. Entsprechend diesem günstigeren Verlauf war die Mortalität der Streptomycin-Tiere geringer (48% gegenüber 79% bei der Kontrollserie, vgl. Tab. 1 und Abb. 3).

Die Harnbefunde ergaben in der Gruppe A (Penicillin) eine mäßige Proteinurie sowie im Sediment eine leichte Leukocyturie und vereinzelt Erythrocyten. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren kamen nicht zum Ausdruck. Die Harnbefunde in der Terramycingruppe (B I und B II) waren entsprechend der leichten Nephritisform noch geringer ausgeprägt als in Gruppe A, wiederum ohne sichere Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Serien. Bei der Schwere

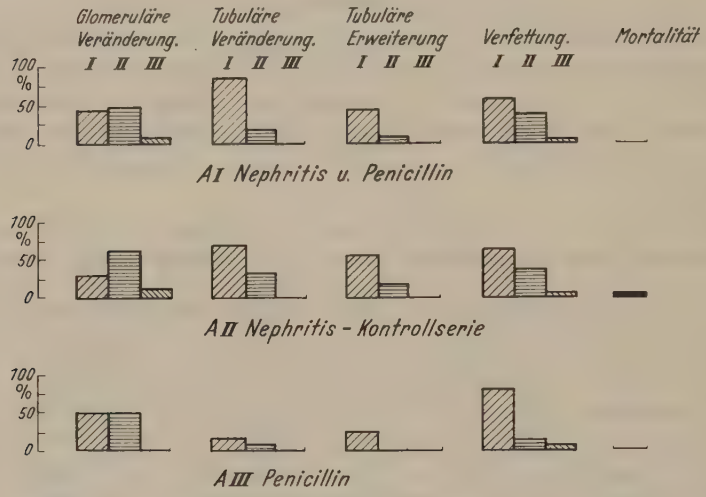


Abb. 1. Graphische Darstellung der histologischen Veränderungen unter prozentualer Aufgliederung nach Schweregraden bei den Versuchsserien der Gruppe A (*I* leicht, *II* mittelschwer, *III* schwer)

der Nephritis der Streptomycinserien (C I, C II) waren hier dagegen reichlich Erythrocyten und Leukocyten sowie vereinzelt Cylinder nachweisbar. Unterschiede in bezug auf Eiweißausscheidung und pathologische Formbestandteile fanden sich auch hier nicht zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Bei der Streptomycin-Nephritisserie (C I) war lediglich der mikroskopische Bakterienbefund im Sediment deutlich geringer als bei der unbehandelten Kontrollserie (C II). Die nur mit Penicillin, Terramycin oder Streptomycin behandelten Normaltiere boten keine pathologischen Veränderungen im Harnbefund.

Die Blutdruckwerte im Versuchsverlauf ergaben in keiner der Gruppen sicher verwertbare Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Nephritisserien. Bei der leichten Verlaufsform der Gruppe B (Terramycin) war der Blutdruckanstieg wesentlich geringer als bei der mittelschweren der Gruppe A (Penicillin) und der schweren der Gruppe C (Streptomycin).

Bei den Streptomycinserien (C I, C II) wurde fernerhin am 17. Versuchstag eine Serumelektrophorese durchgeführt, deren Ergebnisse in

Abb. 4 wiedergegeben sind[1]. Trotz erheblicher pathologischer Erhöhungen vor allem im Bereich der α_1- und α_2-Fraktionen und erheblicher Hypalbuminämie sind keine sicheren Differenzen zwischen beiden Serien nachweisbar. Die bei der Tötung der Tiere festgestellten Rest-N- bzw. Serumharnstoffwerte waren durchweg bei behandelten und unbehandelten Tieren erhöht, auch hier boten sich keine sicheren Differenzen.

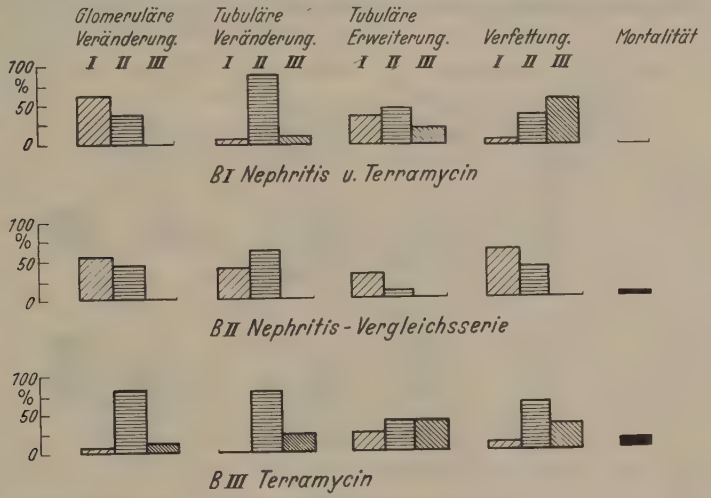


Abb. 2. Graphische Darstellung der histologischen Veränderungen unter prozentualer Aufgliederung nach Schweregraden bei den Versuchsserien der Gruppe B

2. Histologische Befunde. Die Ergebnisse der histologischen Endauswertung werden zahlenmäßig aufgeschlüsselt in Tab. 1 sowie in prozentualer graphischer Aufschlüsselung in Abb. 1—3 zur Darstellung gebracht.

Bei der *Penicillingruppe* (*A*), die einen überwiegend mittelschweren Verlauf und leichte bis mittelschwere entzündliche glomeruläre Veränderungen aufwies, ist kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren nach der Ausprägung der Schweregrade der Nephritis feststellbar, die Normaltiere bieten unter Penicillin lediglich leichte glomeruläre Veränderungen im Sinne einer Glomerulonephrose.

Die *Terramycingruppe* (*B*) bietet bei der Nephritis deutliche Unterschiede hinsichtlich der tubulären Veränderungen und der Verfettungen im Sinne einer stärkeren Ausprägung unter Terramycin. Diese Veränderungen lassen sich unter Zugrundelegung der Kollerschen Tafeln bei Vergleich der mittelschweren tubulären Veränderungen untereinander mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% sichern. Die tubulären Erweiterungen lassen sich bei Zusammenfassung der mittelschweren und schweren Veränderungen mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% im Sinne

[1] Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte im Eiweißlabor unserer Klinik durch Herrn Dr. J. Wendler.

einer Verstärkung unter Terramycingabe sichern. Ebenso ist das stärkere Auftreten einer Verfettung sowohl bei Gegenüberstellung der schweren Veränderungen als auch bei Gegenüberstellung der zusammengefaßten mittelschweren und schweren Veränderungen mit 99% bei der Terramycin-Nephritisserie (B I) signifikant. Auch die mit Terramycin behandelten Kontrolltiere zeigen deutliche glomeruläre und tubuläre Veränderungen sowie Verfettungen als Ausdruck einer nephrotoxischen Wirkung.

Bei der *Streptomycingruppe* (*C*) schließlich sind in der Nephritisserie lediglich stärkere Verfettungen bei Streptomycinbehandlung mit einer

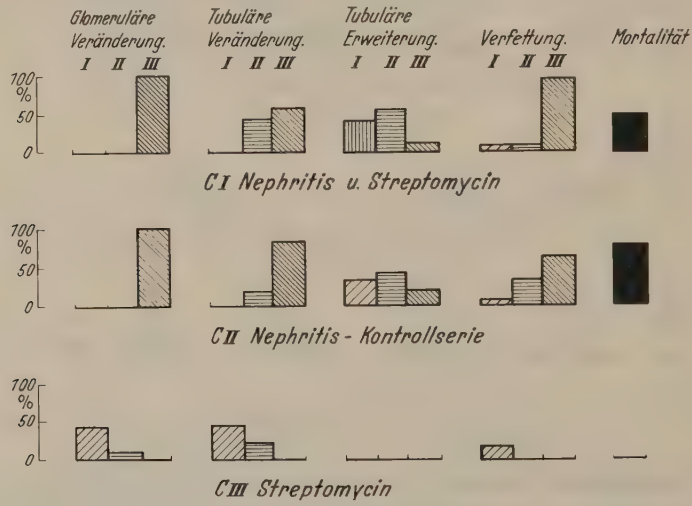


Abb. 3. Graphische Darstellung der histologischen Veränderungen unter prozentualer Aufgliederung nach Schweregraden bei den Versuchsserien der Gruppe C

Wahrscheinlichkeit von 95% zu sichern, sonst ergeben sich keine Differenzen. Die bei Normaltieren auftretenden Nierenveränderungen unter Streptomycinbehandlung sind geringfügig.

Die in B III (Normaltiere mit Terramycinbehandlung) histologisch nach Sudanfärbung beurteilten Lebern zeigen bis auf wenige Ausnahmen leichte bis mittelschwere toxische Verfettungen.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die experimentelle Nephritis durch therapeutische Penicillingaben weder im klinischen Verlauf noch in bezug auf die histologischen Nierenveränderungen beeinflußt wird, es sind also weder toxische Einwirkungen durch die Penicillin-Medikation noch ein günstigerer Verlauf der Nephritis festzustellen. Bei Normalratten lassen sich unter Penicillingabe lediglich leichte glomerulonephrotische Veränderungen nachweisen.

Aus der Literatur sind uns spezielle Untersuchungen über die Einwirkung von Penicillin sowohl auf die Nieren von Normaltieren als auch auf die von Nephritistieren nicht bekannt geworden. In der klinischen Literatur finden sich trotz der

zahlreichen Mitteilungen über allergische Nebenwirkungen des Penicillins, die hier im einzelnen nicht diskutiert werden sollen, nur selten Angaben über allergisch-toxische Nierenschädigungen (Mahon, Anderson, Binet, Spring).

Unsere experimentellen Ergebnisse lassen für die Klinik (mit der Einschränkung möglicher allergischer renaler Auswirkungen) den Schluß zu, daß Penicillin im allgemeinen auch bei entzündlichen Nierenparenchymschäden bei Anwendung der üblichen therapeutischen Dosen unschädlich sein dürfte.

In der Terramycin-Serie ergeben sich in bezug auf den Krankheitsverlauf, die Blutdruckkurven und die Harnbefunde keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Nephritistieren. Aus der Betrachtung der histologischen Veränderungen resultiert jedoch die interessante Feststellung, daß die nur mit Terramycin behandelten Normaltiere sowohl hinsichtlich der Glomerula als auch des tubulären Apparates zum Teil deutliche pathologische Befunde zeigen, einschließlich des Auftretens von tubulären Erweiterungen und Verfettungen (vgl. Tab. 1 und Abb. 2). Die glomerulären Veränderungen sind dabei wie bei den bereits früher von uns diskutierten Sulfonamid-Wirkungen im Sinne einer Glomerulonephrose aufzufassen. Die zusätzlichen tubulären Veränderungen imponieren als Zelldissoziationen einschließlich Zelluntergängen mit Detritus und homogenen Ausgüssen in den Tubuluslumina. Auch die in verschiedener Stärke ausgeprägten tubulären Erweiterungen sind im Sinne einer Tubulusschädigung zu bewerten, ebenso die bei der weitaus größten Zahl der Tiere nachgewiesene mittelschwere bis schwere Verfettung. Diese bei Normaltieren vorliegenden toxischen Parenchymschäden manifestieren sich auch in Form von toxischen Verfettungen an der Leber.

Die unbehandelte Nephritisserie bot histologisch das Bild einer vorwiegend leichten Nephritis sowohl hinsichtlich der glomerulären als auch der tubulären Veränderungen. Durch die zusätzlichen Terramycingaben blieben die glomerulären Veränderungen praktisch in unverändert gleicher Schwere nachweisbar, während die tubulären Veränderungen einschließlich der Erweiterungen und Verfettungen deutlich in Richtung auf die mittelschweren und schweren Veränderungen hin verschoben waren.

Die Terramycin-Medikation unter Anwendung einer in der Klinik üblichen Dosierung verursacht also sowohl bei Normaltieren als bei Nephritistieren deutliche Schädigungen des tubulären Apparates. Diese mögliche zusätzliche toxische Schädigung des Nieren- und auch des Leberparenchym verdient besonders deswegen Beachtung, weil bei schweren infektiösen Zuständen, die zur Anwendung einer Terramycintherapie Anlaß geben, vor allem auch bei der Therapie von Pyelitiden grundsätzlich mit einer begleitenden Nierenparenchymschädigung gerechnet werden muß.

Nephrotoxische Wirkungen des Terramycins wurden in systematischen Mäuseversuchen von Pederzolli nachgewiesen. Er fand unter einer Dosierung von 200 mg/kg/die bei einer Versuchsdauer von 8 Tagen Gewichtsverluste und Oligurie. Histologisch boten die Nieren ein nephroseähnliches Bild mit degenerativen Tubulusveränderungen bei normalen Glomerula. French u. Uran beschreiben bei langdauernden Fütterungsversuchen an Ratten unter kombinierter Anwendung von Streptomycin und Terramycin (Dosierung 20—25 mg/kg/die) bei 2 von 8 Tieren degenerative Tubulusveränderungen. Faloon weist auf eine katabolische Wirkung des Terramycins im Eiweißstoffwechsel hin, der bei Beeinträchtigung der Nierenfunktion zur Azotämie führen kann. Beachtung verdienen ferner die Mitteilungen von Sedwitz, Bateman, Calvin u. Klopp. Sie beobachteten, daß bei Carcinomkranken unter hoher Oxytetracyclindosierung ein Schockzustand mit Oligurie und Rest-N-Erhöhung zustande kam, histologisch waren die Nieren jedoch unverändert. Daraufhin bei Hunden vorgenommene Fütterungsversuche (Dosierung 25 bis 250 mg/kg) führten bei höheren Dosen zu Rest-N-Erhöhung, Gewichtsabnahme, Erbrechen und Tod. Histologisch boten die Tubuli leichte Zellnekrosen, Degenerationen und Pigmentablagerungen. Die Autoren führen den Tod der Tiere auf eine Systemvergiftung infolge zu hohen Terramycinspiegels bei Ausscheidungsinsuffizienz der Nieren zurück.

Von klinischer Seite betonen Eufinger und Stötter die gute Verträglichkeit des Terramycins bei Pyelonephritiden, während Senn einen Fall von tödlicher Hepatonephritis nach Cholecystektomie unter Terramycinbehandlung beschreibt. Im anglo-amerikanischen Schrifttum finden sich auch bei größeren Behandlungsreihen keine Hinweise auf nephrotoxische Wirkung (Pfefer u. Mitarb., Miller u. Walker, Douglas u. Mitarb.).

Auf Grund unserer experimentellen Ergebnisse kommen wir zu dem Schluß, daß Terramycin vor allem bei Vorschädigung des Nierenparenchyms trotz günstiger klinischer Berichte nicht als harmlos angesehen werden kann. Auf mögliche toxische Parenchymschäden sollte bei klinischer Anwendung besonders geachtet werden.

In der Streptomycingruppe (C) ergeben sich deutliche Unterschiede im Krankheitsverlauf und in der Mortalität zwischen behandelten und unbehandelten Tieren zu Gunsten der mit Streptomycin behandelten Nephritisserie. Allerdings sind hier keine sicheren Differenzen in bezug auf den Verlauf der Blutdruckkurven, das Auftreten von Ödemen, die Eiweißausscheidung im Harn und die geformten Bestandteile im Harnsediment vorhanden. Die für das Bild der schweren Nephritis-Nephrose charakteristischen klinischen Zeichen werden also durch das Streptomycin nicht beeinflußt. Die elektrophoretischen Veränderungen im Serum, die in beiden Serien eine erhebliche Hypalbuminämie bei starker Erhöhung der α_1- und α_2-Globuline im Sinne eines akuten entzündlichen Geschehens ergeben, zeigen gleichfalls keine verwertbaren Abweichungen zwischen beiden Serien, ebenso nicht die in beiden Serien erhöhten Rest-N- bzw. Serumharnstoffwerte (Abb. 4).

Parallel hierzu sind auch bei der histologischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede in der Schwere der Veränderungen an Glomerula und Tubuli nachweisbar; lediglich in bezug auf die Verfettungen

bietet die Streptomycin-Nephritis-Serie ein etwas schwereres Bild. Bei Normaltieren verursacht das Streptomycin an den Nieren geringe glomeruläre und tubuläre Veränderungen im gleichen Sinne wie bei der Terramycin-Gruppe, jedoch in wesentlich schwächerer Ausprägung.

Die vorstehende Diskussion zeigt, daß der unter unseren Versuchsbedingungen feststellbare klinisch günstigere Verlauf der mit Streptomycin behandelten Nephritistiere nicht auf einer günstigeren Beeinflussung der nephritischen Veränderungen beruht, sondern wahrscheinlich lediglich auf einer antibiotischen Schutzwirkung gegenüber dem Auftreten von Sekundärinfektionen, für die die schwerkranken Tiere in besonderem Maße empfänglich sein dürften.

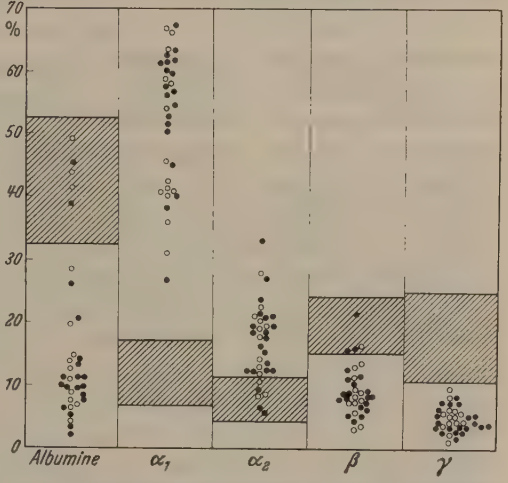


Abb. 4. Elektrophoresediagramm bei Serie C I (Streptomycin + Nephritis •) und Serie C II (Nephritis-Kontrollserie ○). Die Prozentangaben beziehen sich auf das Serumgesamteiweiß. Der schraffierte Bereich schließt einen an gesunden Tieren gewonnenen Mittelwert mit einer Streuung von $\pm 2\,\sigma$ M ein

In der umfangreichen Streptomycinliteratur fanden wir lediglich eine Angabe von Molitor über im Tierexperiment nachgewiesene Nieren- und Leberschädigungen im Sinne von Verfettungen bei Streptomycinbehandlung von Normaltieren, die jedoch reversibel waren. Aus der Klinik berichtet Farrington über das vorübergehende Auftreten einer Cylindrurie bei der Behandlung tuberkulöser Meningitiden. Autoptisch waren jedoch keine Nierenveränderungen bei drei ad exitum gekommenen Fällen seiner Untersuchungsreihe feststellbar. In diesem Zusammenhang muß ferner auf mögliche toxische Kumulationsschäden hingewiesen werden, die bei Niereninsuffizienz und Anurie oder Oligurie durch Streptomycin zustande kommen können (Escher u. Rupp). Staemmler konnte durch Neomycin und Viomycin Tubulusschäden bei Ratten erzeugen.

Insgesamt können wir auf Grund unserer experimentellen Untersuchungen die Streptomycinanwendung bei Nierenparenchymschädigungen im Gegensatz zu der Anwendung von Terramycin nicht für bedenklich ansehen, wenn eine ausreichende Ausscheidungsfähigkeit der Nieren für Streptomycin vorliegt.

Zusammenfassung

An Versuchsserien von jeweils 20—30 Ratten wird die Wirkung von Penicillin (20000 E/kg/die), Terramycin (40 mg/kg/die) und Streptomycin (25 mg/kg/die) auf den Verlauf und die histologischen

Nierenveränderungen bei experimenteller Nephritis sowie die Wirkung dieser Stoffe auf Nieren von Normaltieren bei einer Versuchsdauer von 21 Tagen studiert. Die Untersuchungen wurden an insgesamt 223 Tieren durchgeführt.

Penicillin beeinflußt bei einer mittelschweren Nephritis weder den Verlauf noch die histologischen Manifestationen. Bei Normaltieren verursacht es glomeruläre Veränderungen im Sinne einer mäßig ausgeprägten Glomerulonephrose.

Terramycingaben haben bei einer leichten experimentellen Nephritis gleichfalls keinen Einfluß auf die klinische Manifestation. Die Auswertung der histologischen Nierenbefunde ergibt jedoch eindeutig schwerere tubuläre degenerative Veränderungen, Tubuluserweiterungen und Verfettungen bei den mit Terramycin behandelten Nephritistieren. Auch bei Normaltieren lassen sich durch die Terramycinbehandlung leichte nephrotoxische Wirkungen im Sinne glomerulonephrotischer Veränderungen, Tubulusschäden und Verfettungen nachweisen. Am Leberparenchym finden sich ebenfalls toxische Verfettungen.

Unter Gaben von Streptomycin kommt es bei einer schweren experimentellen Nephritis zu einem leichteren klinischen Verlauf in bezug auf den Allgemeinzustand der Tiere und die Mortalität. Die klinische Manifestation der Nephritis (Harnbefunde, Blutdrucklage, Ödementwicklung, elektrophoretische Serumeiweißveränderungen) sind jedoch in gleich starker Ausprägung vorhanden, ebenso die histologischen Nierenveränderungen bis auf die Verfettungen, die bei der Streptomycin-Nephritisserie in stärkerem Maße ausgeprägt sind. Bei Normaltieren finden sich geringe nephrotoxische Streptomycinwirkungen an Glomerula und Tubuli.

Literatur

Anderson, A. B.: Med. J. Austr. **1947**, 305. — Binet, C.: Rev. de Laryng. etc. **88**, 62 (1947). — Douglas, R. G., T. L. Ball and J. F. Davis: California Med. **73**, 463 (1950). — Escher, F., u. F. Rupp: Acta otolaryng. (Stockh.) **43**, 311 (1953). — Eufinger, H.: Z. Urol. **47**, 743 (1954). — Faloon, W.: J. Labor. a. Clin. Med. **44**, 75 (1954). — Farrington, R. F., H. Hull-Smith, P. Bunn and W. McDermott: J. Amer. Med. Assoc. **134**, 679 (1947). — French, C. E., J. A. Uram., R. H. Ingrim and R. W. Swift: J. Nutrit. **54**, 75 (1954). — Krautwald, A., H. Dutz u. K. Voigt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **231**, 455 (1957). — Mahon, W. E.: Proc. Roy. Soc. Med. **44**, 150 (1951). — Miller, F. L., and R. Walker: New. England J. Med. **249**, 478 (1953). — Molitor, H., zit. n.: Herrel-Schulze: Penicillin u. andere Antibiotica. S. 441. Stuttgart: S. Hirzel 949. — Pederzolli, G.: Minerva med. (Torino) **1956**, 659. — Pfefer, J. M., F. J. Hughes and W. E. Dye: Dis. of Chest. **21**, 123 (1952). — Sedwitz, J., J. C. Batemann, and C. T. Klopp: Antibiotics a. Chemother. **3**, 1015 (1953). — Senn, A.: Praxis **20**, 407 (1953). — Spring, M. D.: J. Amer. Med. Assoc. **147**, 1139 (1951). — Staemmler, M., u. B. Karhoff: Virchows Arch. **328**, 481—502 (1956). — Stötter, G.: Medizinische **1952**, 1099 u. 1150.

Professor Dr. A. Krautwald,
II. Medizinische Univ.-Klinik u. Poliklinik der Charité, Berlin N 4, Schaumannstr. 21

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 473—478 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Die Wirkung von Thiopental-Natrium und Pentobarbital-Natrium auf die Nierengefäße von Mäusen

Von
G. Kuschinsky, P. Jungblut, H. Vorherr und B. Cullmann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1957)

In einer vorangegangenen Arbeit (Jungblut u. Kuschinsky 1955) wurde über den Einfluß der Äthernarkose auf den Gefäßtonus von Mäusenieren berichtet. Dabei konnte im Excitations- und Toleranzstadium eine erhöhte Tonisierung der Nierengefäße beobachtet werden, während im Asphyxiestadium eine starke Blutfülle als Folge einer Gefäßdilatation in der Niere festzustellen war.

Im folgenden teilen wir die Ergebnisse von Versuchen mit, die die Frage einer möglichen Wirkung von Natrium-Äthyl-(-1-methyl-butyl)-barbiturat (Pentobarbital-Natrium)[1] und Natrium-Äthyl-(-1-methyl-butyl)thiobarbiturat (Thiopental-Natrium)[1] auf die Nierengefäße von Mäusen klären sollen.

Methode

Die Versuche wurden an männlichen und weiblichen Mäusen im Gewicht von 20—30 g durchgeführt. Der Nierengefäßtonus wurde nach der Methode von Jungblut u. Kuschinsky untersucht: 4—5 Tage vor dem Versuch wurde in Äthernarkose eine Perlonschlinge um den linken Nierenstiel gelegt. Infektionsprophylaxe mit Aquacillin[1] oder Combiotic[1]. Im Versuch Unterbinden des linken Nierenstiels und unmittelbar darauf gleichzeitiges Durchtrennen der Tiere zwischen Nieren und Zwerchfell und Dekapitieren. Aufarbeiten der Nieren nach Slonimsky u. Cunge. Zur Erreichung einer möglichst tiefen Narkose wurden Thiopentaldosen von 85 und 100 mg/kg, von Pentobarbital 67,5, 90 und 100 mg/kg i.v. injiziert. Die Injektionsdauer betrug 1 min. Der Nierengefäßtonus wurde unter Thiopental 2 und 10 min, unter Pentobarbital 30 und 50 min nach Narkosebeginn untersucht. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Blutverteilung in den Nieren von Mäusen in Thiopental- und Pentobarbitalnarkose ohne Unterbindung des linken Nierenstiels bei sonst gleichen Versuchsbedingungen dargestellt. Kontrolltiere erhielten an Stelle von Barbituraten vergleichbare Volumina 0,9%ige NaCl-Lösung i.v.

Die Beeinflussung des Blutdrucks durch Thiopental- bzw. Pentobarbitalnarkose untersuchten wir blutig in der Arteria carotis nach Kuschinsky u. Vorherr.

[1] Für die freundliche Überlassung der genannten Substanzen danken wir folgenden Firmen: Abbot Laboratories, Chicago (Nembutal = Pentobarbital); Chemische Fabrik Promonta (Trapanal = Thiopental); Farbenfabriken Bayer (Aquacillin) und Chas. Pfizer bzw. Boehringer, Ingelheim (Combiotic).

Ergebnisse

Die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung bewirkte nur in wenigen Fällen einen Unterschied in der Blutfüllung zwischen unterbundenen und nicht unterbundenen Nieren. Meistens entsprach die Füllung der Gefäße in unterbundenen und nicht unterbundenen Nieren dem in Abb. 1 gezeigten Beispiel.

Thiopental führte trotz der hohen Dosierungen nur zu einer kurzen und unvollständigen Narkose. Sehr häufig traten schon nach 2 min und

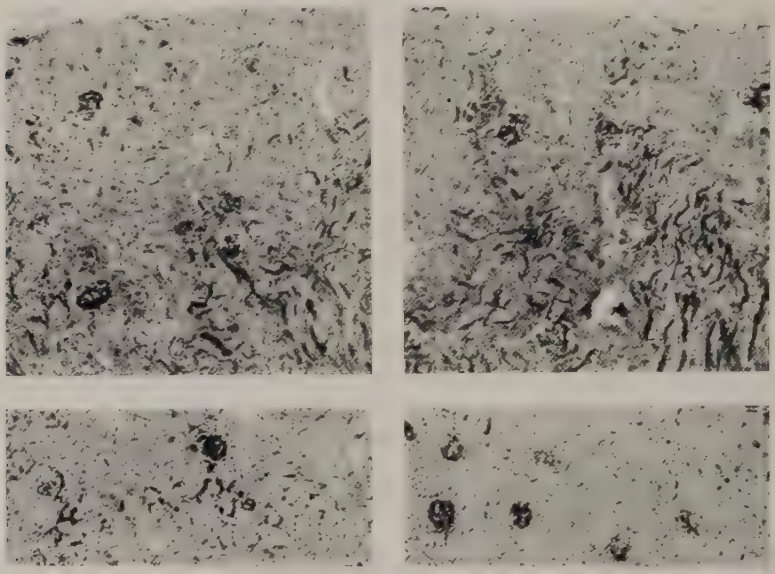


Abb. 1. Links: Unterbundene linke Niere. Rechts: Nicht unterbundene rechte Niere. Oben: Rindenausschnitte. Unten: Rindentangentialschnitte. Intravenöse Injektion von 5 mm³ 0,9%iger NaCl-Lösung/2 g Maus. Kein Unterschied zwischen rechter und linker Niere. Darstellung aller Rindengefäße mit normalem Blutgehalt. Normaler Gefäßtonus

früher wieder Schmerzreflexe und Excitationen auf, nach weiteren 8 bis 10 min Stellreflexe. Die Atmung (normal 130—180 Atemzüge/min) war zu Beginn der Narkose verlangsamt, wurde aber bald wieder frequenter und lag nur bei einem kleinen Teil der Tiere kurze Zeit unter 100/min. Im histologischen Schnitt wiesen die unterbundenen Nieren eine gleichmäßig gute Blutfülle in allen Gefäßbezirken auf. Die nicht unterbundenen Nieren zeigten im Gegensatz dazu einen merklich reduzierten Füllungszustand. Die venösen Gefäßabschnitte dieser Nieren waren in einem hohen Prozentsatz nahezu völlig blutleer. Glomerula und arterielle Gefäße fehlten in einem Teil der Fälle ganz, zum größten Teil waren sie, allerdings schwächer gefüllt als normal, sichtbar. Abb. 2 gibt das typische Verhalten der Nierengefäße in Thiopentalnarkose wieder.

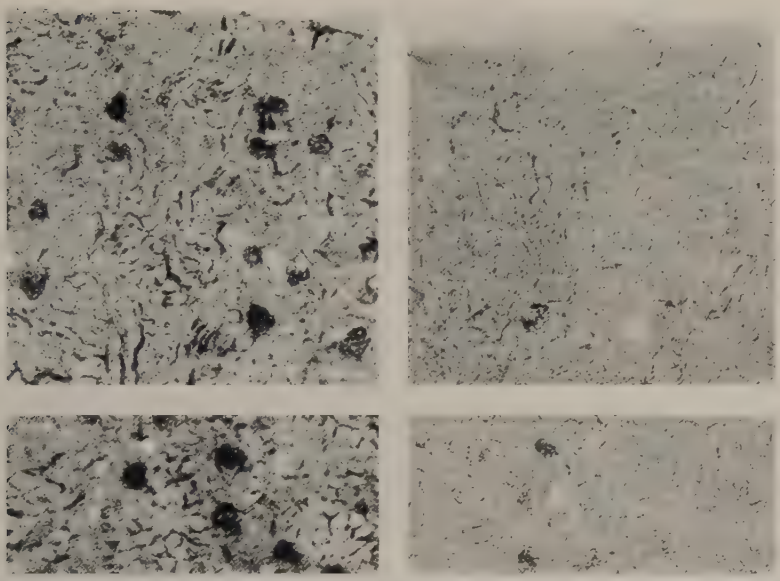


Abb. 2. Verteilung der Teilbilder s. Abb. 1. 85 mg/kg Thiopental i.v. Füllungsunterschied zwischen rechter und linker Niere. Links: Alle Rindengefäße dargestellt. Rechts: Wenig Glomerula, nur vereinzelt Intertubulärcapillaren. Gefäßtonus mäßig erhöht

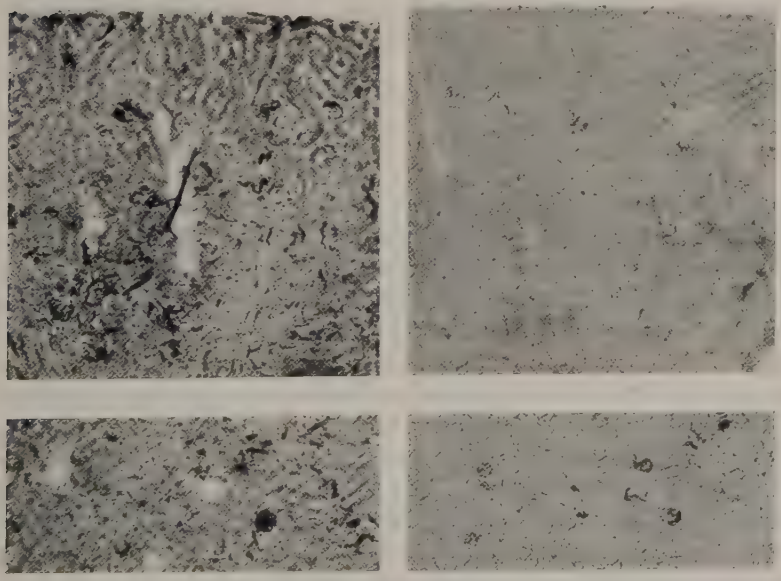


Abb. 3. Verteilung der Teilbilder s. Abb. 1. 67,5 mg/kg Pentobarbital i.v. Füllungsunterschied zwischen linker und rechter Niere. Links: Relativ wenig Glomerula, Darstellung von Intertubulärcapillaren und arteriellen Rindengefäßen. Rechts: Nahezu blutleere Rinde, wenige, schlecht gefüllte Glomerula, Intertubulärcapillaren weitgehend ausgelaufen. Stark erhöhter Gefäßtonus

Verglichen mit der flüchtigen Wirkung von Thiopental zeigte die Narkose mit Pentobarbital einen erheblich längeren und ruhigeren Verlauf. Die untersuchten Dosen führten immer zu einer 3—4stündigen, tiefen Narkose mit völliger Entspannung, wobei eine starke Herabsetzung der Atemfrequenz auf durchschnittlich 40—60 Atemzüge/min auffiel. Schmerzreflexe waren bei weniger als der Hälfte der Tiere kurz vor dem Töten nach Reizsummation angedeutet. In den unterbundenen Nieren war die Anzahl der dargestellten Gefäße, besonders in der Rinde

Tabelle 1

	Gesamttierzahl	Gefäßtonus „normal" Tierzahl absolut	%	Gefäßtonus mäß. erhöht Tierzahl absolut	%	Gefäßtonus stark erhöht Tierzahl absolut	%
0,9% NaCl-Lösung							
22 Tiere getötet nach 2—10 min linke Niere unterbunden	22	18	81,8	4	18,2	0	0
16 Tiere getötet nach 2—10 min beide Nieren nicht unterbunden . . .	16	11	68,8	3	18,8	2	12,5
Thiopental 85 und 100 mg/kg							
32 Tiere getötet nach 2—10 min linke Niere unterbunden	32	2	6,3	17	53,1	13	40,6
26 Tiere getötet nach 2—10 min beide Nieren nicht unterbunden . . .	26	0	0	13	50	13	50
Pentobarbital 67,5, 90 und 100 mg/kg							
34 Tiere getötet nach 30—60 min linke Niere unterbunden	34	1	2,9	4	11,8	29	85,3
32 Tiere getötet nach 30—60 min beide Nieren nicht unterbunden . . .	32	0	0	7	21,9	25	78,1

deutlich verringert. Sichtbar waren meist nur sektorenweise arterielle Gefäße und die zugehörigen Glomerula mit mäßiger Blutfüllung, sowie wenige Intertubulärcapillaren. Die größere Anzahl der nicht unterbundenen Nieren hatte extrem blutleere Rinden. Intertubulärcapillaren fehlten gänzlich. Glomerula und arterielle Gefäße waren meist nur mit wenigen Erythrocyten markiert. Bei einem Teil der Tiere waren in den Rinden zwar wenige arterielle Gefäße und Glomerula dargestellt, jedoch mit merklich reduziertem Füllungszustand. Abb. 3 entspricht einer mittleren Reaktion der Nierengefäße auf Pentobarbital. Innerhalb des gewählten Dosenbereiches (Tab. 1) hatten die höheren Dosen beider Substanzen keine größere Wirkung auf die Nierengefäße als die niedrigeren. Ebenso wurden die Ergebnisse durch die Zeit des Tötens (Tab. 1) nicht beeinflußt.

In Tab. 1 werden die beobachteten Wirkungen von i.v. Injektionen von 0,9%iger NaCl-Lösung, Thiopental und Pentobarbital auf die Nierengefäße von Mäusen miteinander verglichen. Wir unterscheiden zwischen

„normalem", mäßig und stark erhöhtem Gefäßtonus. Bei „normalem" Gefäßtonus sind alle Nierengefäße in unterbundenen und nicht unterbundenen Nieren gleich gut gefüllt. Die Erhöhung des Gefäßtonus bezieht sich hauptsächlich auf die Rindengefäße. Als mäßig erhöhten Gefäßtonus bezeichnen wir eine verminderte Darstellung der Gefäße in nicht unterbundenen Nieren, während die entsprechenden unterbundenen Nieren gut blutgefüllt sind. Stark erhöhter Gefäßtonus entspricht einer fast oder vollständig leeren Nierenrinde in den nicht unterbundenen Nieren, wozu noch in den Pentobarbitalversuchen eine verringerte Rindenfüllung in den unterbundenen Nieren kommt. Die Versuche, in denen der linke Nierenstiel nicht unterbunden wurde, sind dem Füllungszustand der Nieren entsprechend eingeordnet.

Aus Tab. 1 ist zu entnehmen, daß nach Thiopental der Nierengefäßtonus in einem mittleren Maße ansteigt, während Pentobarbital eine starke Tonuserhöhung verursacht.

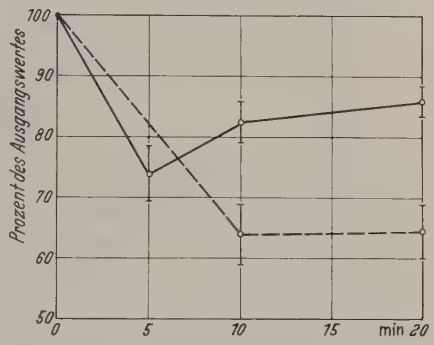


Abb. 4. Arterieller Blutdruck der Maus nach i.v. Injektion von 50 mg/kg Thiopental (—— 21 Tiere) und von 100 mg/kg Pentobarbital (- - - 10 Tiere) in Prozent des Ausgangswertes. Angegeben sind die Mittelwerte und ihre Streuung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Die Blutdruckmessungen wurden an 31 Mäusen durchgeführt. Der Ausgangswert betrug 96 mm Hg. Thiopental (21 Tiere) 50 mg/kg i.v. bewirkte nach 10 min einen mittleren Druckabfall von 17,5 ± 3,1 mm Hg, nach 20 min war noch eine Senkung von 13,9 ± 2,4 mm Hg festzustellen (Abb. 4).

Die Blutdrucksenkung nach Pentobarbital (10 Tiere) 100 mg/kg i.v. betrug nach 10 min im Mittel 34,4 ± 4,8 mm Hg. Auch 20 min nach Injektion war der Druckabfall noch unverändert 34 ± 4,6 mm Hg (Abb. 4).

Diskussion

Die in der Arbeit verwendete Methode zur Erfassung des Nierengefäßtonus von Mäusen ist von Jungblut u. Kuschinsky kritisch diskutiert worden.

Bei der Betrachtung des gefundenen Einflusses von Thiopental und Pentobarbital auf den Nierengefäßtonus ist die Narkosetiefe zu beachten. Trotz Verwendung hoher Dosen Thiopental gelang es nicht, bei Mäusen eine tiefe Narkose zu erzielen. Pentobarbital in gleicher Dosierung wie Thiopental führte zu einer tiefen Narkose mit nahezu völliger Analgesie, Muskelentspannung und starken Atemdepressionen, bei einer Narkosedauer von 3 Std und länger.

Entsprechend der größeren Narkosetiefe senkte Pentobarbital den Blutdruck in der A. carotis wesentlich stärker als Thiopental (Abb. 4).

Der Unterschied zwischen unterbundenen und nicht unterbundenen Nieren läßt auf eine Erhöhung des Rindengefäßtonus schließen; diese war nach Pentobarbital stärker als nach Thiopental. Die Gefäßdarstellung in den histologischen Schnitten erlaubt nicht ohne weiteres auf eine veränderte Durchblutung zu schließen. Da jedoch nach Pentobarbital nicht nur eine starke Verminderung der Blutfülle der Nierenrindengefäße auftrat, sondern auch gleichzeitig eine deutliche Abnahme des Blutdruckes registriert wurde, sprechen die Ergebnisse für eine Abnahme der Nierendurchblutung in der Pentobarbitalnarkose.

Summary

The action of intravenous injections of pentobarbital and of thiopental on the blood pressure and on the vascular tone in the cortex of the kidney has been studied in albino mice. Pentobarbital caused a pronounced decrease of the filling of blood vessels in the cortex of kidneys together with a long-lasting anaesthesia and a long lasting fall of blood pressure. Thiopental, on the other hand, was less effective on the filling of blood vessels, while its narcotic effect was small and the fall of blood pressure less pronounced. The results indicate that both substances increased the vascular tone in the cortex of the kidney.

Literatur

Jungblut, P. W., u. G. Kuschinsky: Eine Methode zur Beurteilung des Nierengefäßtonus bei Mäusen. Das Verhalten der Nierengefäße der Mäuse in den verschiedenen Stadien der Äthernarkose. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 154 (1955). — Kuschinsky, G., u. H. Vorherr: Über eine einfache rußkymographische Methode zur fortlaufenden Blutdruckmessung an Mäusen und Ratten. Experientia (Basel) **13**, 298 (1957). — Slonimsky, P. H., u. M. Cunge: Ein neues Verfahren der elektiven Färbung der Blutgefäße im Zentralnervensystem. Folia morph. (Warszawa) **7**, 126 (1937); zit. n. Zbl. Neur. **87**, 561 (1938).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakolog. Institut der Universität Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 479—487 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky) und der Frauenklinik der Universität Mainz (Direktor: Prof. Dr. H. Schwalm)

Über den Einfluß der Hormone des Nebennierenmarks auf die Blutverteilung in Mäusenieren

Von

G. Kuschinsky, H. Vorherr und U. Trendelenburg

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1957)

Jungblut u. Kuschinsky (1955) untersuchten das Verhalten der Gefäße von Mäusenieren während der verschiedenen Stadien der Äthernarkose. Im Asphyxiestadium wurde eine auffällig starke Blutfülle der Nieren beobachtet. Jungblut (1955a) fand eine kurzdauernde Erweiterung der Nierengefäße nach der i.v. Injektion von Adrenalin. Da eine Äthernarkose zu einer Verringerung des Adrenalingehaltes von Mäusenebennieren führt (Jungblut 1955b), sind die während des Asphyxiestadiums der Äthernarkose aufgetretenen Veränderungen wohl auf eine Ausschüttung von Hormonen aus dem Nebennierenmark zurückzuführen.

Es war daher von Interesse, folgende Untersuchungen durchzuführen: 1. Registrierung der Blutdruck- und Nierenveränderungen während der Äthernarkose; 2. Bestimmung der durch Schmerzreiz bedingten Blutdruck- und Nierenveränderungen; 3. Beobachtung des Einflusses der Adrenalektomie auf die in beiden Versuchsreihen registrierten Veränderungen.

Methodik

Es wurden 206 weiße Mäuse von 20—30 g verwandt (60 für Blutdruckversuche, 166 zur histologischen Untersuchung). Der arterielle Blutdruck wurde nach Kuschinsky u. Vorherr (1957) blutig von der A. carotis gemessen.

Zur Untersuchung der Blutverteilung in der Niere wurden folgende 10 Gruppen von Versuchstieren eingesetzt:

1. Unbehandelte Tiere (10 Tiere).

2. Physiologische Kochsalzlösung (0,1—0,2 ml) wurde s.c. oder i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Tiere wurden $^1/_4$—30 min später getötet. Die Zusammenfassung aller Tiere in eine Gruppe war gerechtfertigt, da der Zeitpunkt des Todes keinen Einfluß auf die Blutfüllung der Nieren hatte (76 Tiere).

3. Adrenalin: 5 Tiere erhielten 0,5 γ Adrenalin i.v. während 2 min, 5 Tiere 1 γ i.v. während 1 min. Die Tiere wurden sofort nach Beendigung der Injektionen getötet.

4. Nor-Adrenalin: wie Adrenalin (10 Tiere).

5. Adrenalektomie: In Äthernarkose wurden unter möglichster Schonung der Nieren beide Nebennieren vom Rücken her entfernt. Die Tiere wurden 20 min später getötet (10 Tiere).

6. Schmerzreiz: 10 unbetäubte Tiere wurden 15 sec lang mit einer Klemme intensiv in Schwanz und Hinterextremitäten gekniffen und anschließend sofort getötet.

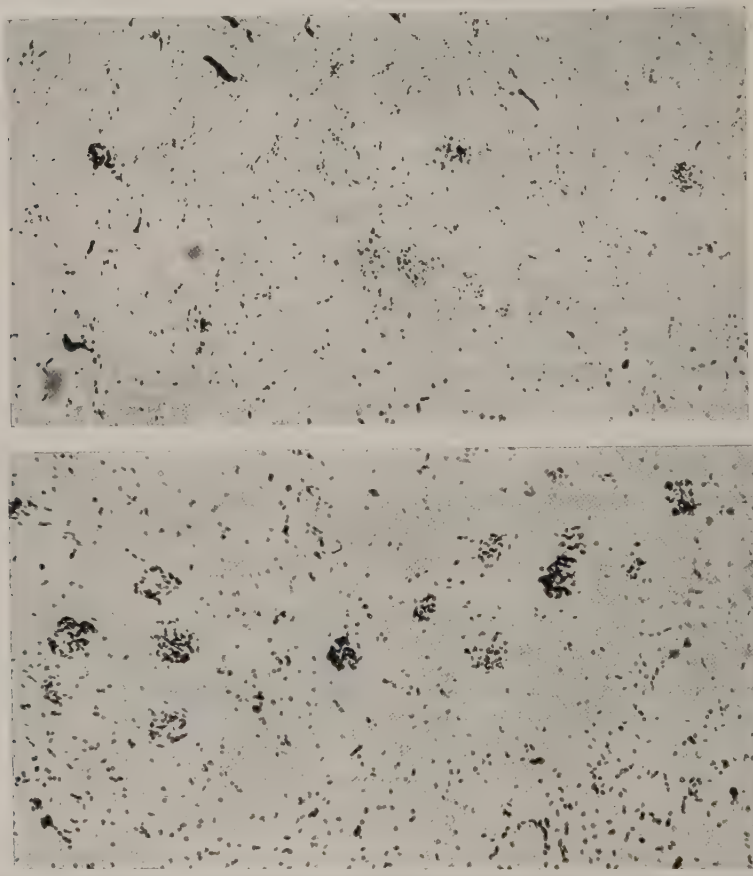


Abb. 1a u. b. Nierenschnitte (Rindensektoren, Benzidinfärbung) mit schwacher (a), mäßiger (b), starker (c) und sehr starker (d) Füllung der Blutgefäße. Die teilweise sichtbaren Gefäße des Nierenmarks wurden nicht bewertet

7. Schmerzreiz nach Scheinoperation: 20 min vor Erregung der Tiere durch Schmerzreiz (siehe 6.) wurde unter Äthernarkose eine Scheinoperation von gleicher Dauer wie die Adrenalektomie (8 min) durchgeführt (10 Tiere).

8. Schmerzreiz nach Adrenalektomie: (wie 6.), aber 20 min nach Adrenalektomie (10 Tiere).

9. Asphyxie in Äthernarkose: 10 Tiere wurden unter Kontrolle des Blutdruckes im Asphyxiestadium der Äthernarkose (Schnappatmung) bei einem Abfall des Blutdruckes auf 50 mm Hg getötet.

10. Asphyxie in Äthernarkose und nach Adrenalektomie: (wie 9.), aber 20 min nach Adrenalektomie (10 Tiere).

Die Tiere wurden mit einer Doppelschere gleichzeitig zwischen Zwerchfell und Nieren durchtrennt und dekapitiert. Eine Niere (alternierend die rechte bzw. linke) wurde sofort nach dem Tode des Tieres entnommen. Die Aufarbeitung erfolgte in 40 μ Seriengefrierschnitten nach der Methode von Slonimski u. Cunge: Fixierung der Organe 20 Std in einer Lösung von 4% Formaldehyd, 4% NaCl und 1,6% $K_3(Fe(CN)_6)$, danach 2 Std wässern, anschließend gefrierschneiden. Erythrocytenfärbung in gesättigter alkoholischer Benzidin- und 3% Wasserstoffsuperoxydlösung,

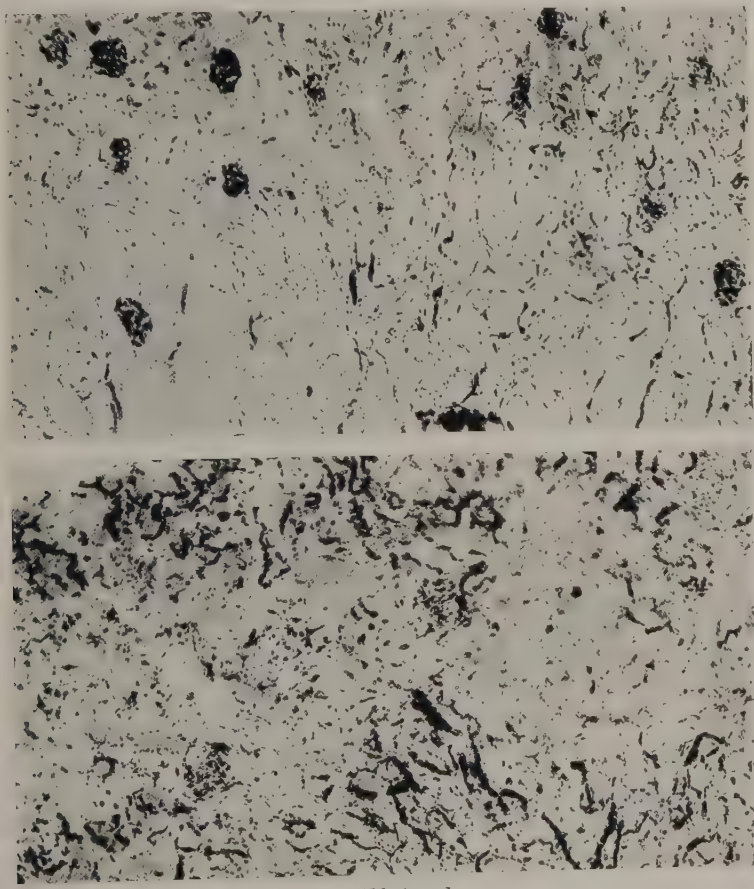


Abb. 1 c u. d

Eindecken der gefärbten Schnitte in Caedax. Von jeder Niere wurde der mittlere Rindensektor der Konvexität eines Schnittes mikro-photographiert.

Auswertung der histologischen Befunde. Es wurden 4 Photographien ausgesucht, die jeweils eine Niere mit schwacher, mäßiger, starker und sehr starker Blutfüllung darstellten (Abb. 1). Alle von den oben angeführten 166 Versuchen stammenden Photographien wurden von 6 verschiedenen Beobachtern entsprechend den 4 Musterbildern in 4 Gruppen eingeteilt. Die Beobachter arbeiteten unabhängig voneinander und ohne zu wissen, aus welcher Versuchsgruppe die Bilder stammten.

Für die statistische Auswertung erhielt jedes Bild bei jeder der 6 Bewertungen eine „Meßzahl", und zwar die Zahl 1 bei schwacher, 2 bei mäßiger, 3 bei starker und 4 bei sehr starker Blutfüllung. Da jedes Bild von insgesamt 6 Beobachtern bewertet wurde, mußte schließlich die Summe der Meßzahlen durch 6 dividiert werden.

Die Zerlegung der Gesamtstreuung aller 166 Nierenschnitte nach Snedecor (1950) ergab, daß die Bewertungen der verschiedenen Beobachter nicht signifikant differierten (Tab. 1, S. 485). Der Beobachterfehler kann daher im folgenden vernachlässigt werden.

Aus den Meßzahlen der einzelnen Bilder wurden die Mittelwerte der 10 Versuchsgruppen und ihre Streuung errechnet. Die Unterschiede wurden mit dem t-Test (Fisher 1950) auf Signifikanz geprüft.

Ergebnisse

A. Blutdruckversuche. Bei 8 Mäusen wurde in leichter Äthernarkose der arterielle Blutdruck gemessen. Bei einem intensiven Schmerzreiz (Kneifen des Schwanzes und der Hinterextremitäten), der 2 min andauerte, wurde in allen Fällen ein deutlicher Anstieg des Blutdruckes um $+ 24{,}8 \pm 2{,}1$ mm Hg beobachtet, der am Ende der Reizperiode noch $+ 15{,}5 \pm 2{,}9$ mm betrug (Abb. 2a). Sofort nach Beendigung des Schmerzreizes fiel der Blutdruck auf den Ausgangswert oder etwas darunter ab. Die langsame Infusion von 0,3—0,5 γ Adrenalin bzw. Nor-Adrenalin (während 2 min) rief eine ähnliche Veränderung des Blutdruckes hervor (Abb. 2a).

6 weiteren Mäusen wurden die Nebennieren entfernt. 20 min nach der Operation wurde der gleiche Versuch durchgeführt, und es zeigte sich, daß der Blutdruckanstieg nach Schmerzreiz abgeschwächt oder aufgehoben war (Abb. 2b), während die langsame i.v. Injektion von Adrenalin noch blutdrucksteigernd wirkte, und zwar stärker als bei den nicht operierten Tieren. Dies mag bedingt sein durch den signifikant niedrigeren Ausgangsblutdruck, den die adrenalektomierten Tiere aufwiesen ($P < 0{,}001$). Die Berechnung der Mittelwerte der Blutdruckveränderungen während des Schmerzreizes zeigte, daß der maximale Blutdruckanstieg der adrenalektomierten Tiere auf $+ 10{,}8 \pm 2{,}3$ mm Hg signifikant abgeschwächt war ($P < 0{,}001$), während am Ende der Reizperiode der Blutdruck (bei starker Streuung) im Durchschnitt um $6{,}8 \pm 4{,}6$ mm Hg unter den Ausgangswert abgefallen war. Der Blutdruck war am Ende der Reizperiode signifikant niedriger als bei den nicht operierten Kontrolltieren ($P < 0{,}01$).

Äthernarkose: 14 von 19 normalen Mäusen zeigten im Asphyxiestadium der Äthernarkose (Schnappatmung mit Bewegungen des Unterkiefers) einen Wiederanstieg des fallenden Blutdruckes. Bei adrenalektomierten Mäusen war dieser Wiederanstieg nur bei 4 von 15 Mäusen angedeutet, bei den anderen Tieren fiel der Blutdruck bei ausgeprägter Asphyxie innerhalb von 3 min stetig ab.

B. Histologische Befunde. Abb. 3 gibt einen Überblick über die Blutfülle von Nierenschnitten nach verschiedenen Behandlungen. Gegenüber den Kochsalzkontrollen (Abb. 3*a*) waren die Nieren adrenalinbehandelter Mäuse (Abb. 3*b*) in Bestätigung der Befunde von JUNGBLUT (1955a) deutlich stärker mit Blut gefüllt ($P < 0{,}02$). Nor-Adrenalin in gleicher Dosierung (Abb. 3*c*) hatte eine starke Wirkung ($P < 0{,}01$), war aber von der des Adrenalins nicht signifikant verschieden ($P > 0{,}4$).

Ein Unterschied zwischen den unbehandelten Tieren, d. h. Tieren, die keine Injektionen erhalten hatten (Abb. 3*d*), und den Kochsalzkontrollen (Abb. 3*a*) war nicht nachzuweisen ($P > 0{,}05$). Einer weiteren

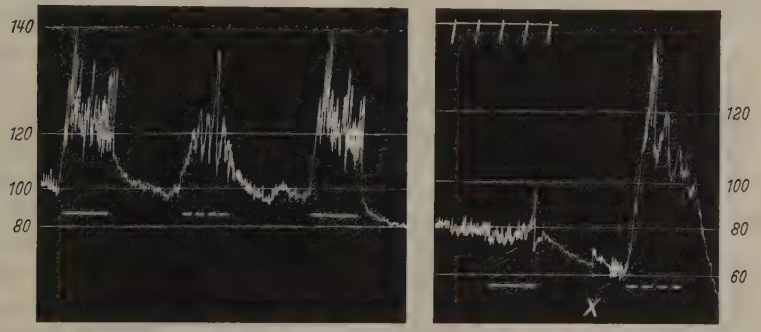


Abb. 2. Mäuse in leichter Äthernarkose, arterieller Blutdruck. (a) normales, (b) adrenalektomiertes Tier. Erregung für 2 min durch Kneifen des Schwanzes und der Hinterextremitäten (—). Infusion von 0,5 γ Adrenalin i.v. (----). Bei *X* 3 min Stillstand des Kymographions, Zeitschreibung: 1 min

Gruppe von 10 Tieren (Abb. 3*e*) wurden in Äthernarkose die Nebennieren entfernt. 20 min später wurden die Tiere nach völligem Erwachen getötet. Ihre Nieren zeigten eine Blutfülle, die deutlich stärker war als die der unbehandelten Kontrollen ($P < 0{,}01$).

Die Tiere, deren sympathisches System durch Schmerzreiz erregt wurde, waren nicht betäubt. Da in den Blutdruckversuchen beobachtet worden war, daß ein maximaler Blutdruckanstieg 10 sec nach Beginn der Reizung erzielt wurde, wurden diese Tiere nach 10—15 sec langem intensivem Kneifen des Schwanzes und der Hinterextremitäten getötet. Ihre Nieren waren sehr stark mit Blut gefüllt (Abb. 3*f*). Im Gegensatz dazu waren die Nieren von adrenalektomierten Tieren nach Schmerzreiz (Abb. 3*h*) nur so stark mit Blut gefüllt wie die der (adrenalektomierten) Kontrollen (Abb. 3*e*). Die Tiere hatten sich von der Operation völlig erholt und reagierten 20 min nach Ende der Äthernarkose auf den Schmerzreiz mit Abwehrbewegungen und Fluchtversuchen in gleicher Weise wie die nicht operierten Tiere der Gruppe (Abb. 3*f*). Die bei der Adrenalektomie unvermeidliche Berührung und eventuelle leichte Zerrung der Nieren kann für die schwache Blutfüllung der Nieren nicht

verantwortlich gemacht werden, da scheinoperierte Tiere, deren Nieren der gleichen Behandlung ausgesetzt worden waren, gleichfalls mit einer verstärkten Blutfülle reagierten (Abb. 3g). Wegen der verhältnismäßig großen Streuung der Resultate war der Unterschied zwischen den nicht operierten (Abb. 3f) und den adrenalektomierten Tieren (Abb. 3h) nicht signifikant ($P > 0{,}05$). Wurden jedoch die adrenalektomierten Tiere (Abb. 3h) mit beiden, intakte Nebennieren enthaltenden Gruppen (Abb. 3f u. 3g) verglichen, so ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0{,}05$).

Ähnliche Verhältnisse lagen beim Asphyxiestadium der Äthernarkose vor. Tiere mit intakten Nebennieren (Abb. 3i) hatten sehr stark blutgefüllte Nieren, wie bereits Jungblut u. Kuschinsky (1955) zeigten; die adrenalektomierten Tiere (Abb. 3k) dagegen zeigten eine Blutfülle, die der Gruppe (Abb. 3e) entsprach (Adrenalektomie ohne weitere Eingriffe). Der durch die Adrenalektomie bedingte Unterschied zwischen den Gruppen Abb. 3i u. 3k war signifikant ($P < 0{,}01$).

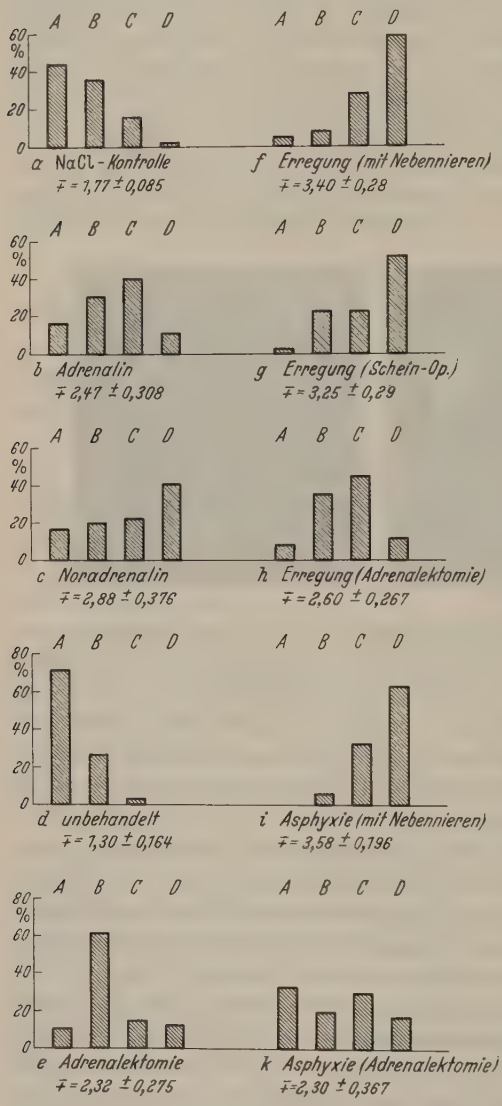


Abb. 3. Aufgliederung der 10 Versuchsgruppen entsprechend den vier Mustern (Abb. 1). Nähere Erläuterung s. Text. Ordinate: Prozent der Tiere; Abszisse: Grad der Blutfüllung der Nierenrinde. *A* schwach, *B* mäßig, *C* stark, *D* sehr stark mit Blut gefüllt. — a Injektion von physiologischer Kochsalzlösung; b i.v. Injektion von Adrenalin; c i.v. Injektion von Nor-Adrenalin; d unbehandelte Tiere; e Adrenalektomie; f Schmerzreiz (normale Tiere); g Schmerzreiz nach Scheinoperation; h Schmerzreiz nach Adrenalektomie; i Asphyxiestadium in Äthernarkose (normale Tiere); k Asphyxiestadium in Äthernarkose nach Adrenalektomie. Angegeben ist der Mittelwert jeder Versuchsgruppe mit seiner Streuung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Tabelle 1. *Varianzanalyse aller histologischen Bilder*

		d. f.	s^2	F P
Gesamtstreuung	190,67	165		
Zwischen Versuchsgruppen .	72,81	9	8,09	$10{,}85 < 0{,}001$
Zwischen Beobachtern . . .	5,52	5	1,104	$1{,}485 < 0{,}1$
Rest	112,34	151	0,744	

Legt man die letzten 5 Gruppen zusammen und vergleicht die Nierenbilder der adrenalektomierten Tiere (Abb. 3*h* u. 3*k*) mit denen von Tieren mit intakten Nebennieren (Abb. 3*f*, 3*g* u. 3*i*) (unter Vernachlässigung der Scheinoperation und der verschiedenen Behandlungen), so ist der durch die Adrenalektomie bedingte Unterschied hochsignifikant ($P < 0{,}001$).

Besprechung der Ergebnisse

Eine exakte quantitative Messung der Blutfülle eines Organes an Hand von histologischen Schnitten stößt auf große Schwierigkeiten. Mit der von uns gewählten Methode der Auswertung wollten wir nicht absolute Werte der Blutfülle ermitteln, sondern lediglich Veränderungen innerhalb eines gewissen Bereiches feststellen.

Dabei ist es nicht wesentlich, ob das mit der Meßzahl 4 bewertete Musterbild *d* (Abb. 1) tatsächlich eine viermal stärkere Blutfülle aufweist als das Bild *a* (Meßzahl 1). Die errechneten Mittelwerte (Abb. 3) müssen daher stets auf die 4 Musterbilder der Abb. 1 bezogen werden und stellen keine absoluten Werte dar. Trotz dieser Einschränkung erlaubt diese Methode eine eindeutige Aussage über Veränderungen der Blutfülle von Nierengefäßen innerhalb des gewählten Bereiches.

Die Streuung innerhalb der Versuchsgruppen war so erheblich, daß zur statistischen Sicherung der Ergebnisse mindestens 10 Tiere pro Gruppe eingesetzt werden mußten. Diese Zahl reichte nicht aus, wenn die Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen verhältnismäßig gering waren; in diesem Fall brachte erst die Zusammenlegung mehrerer Gruppen den statistischen Beweis einer signifikant veränderten Reaktion. Diese Beobachtungen sind ein schwerwiegender Einwand gegen alle an einem kleinen Tiermaterial erhobenen Befunde.

Jungblut (1955a) beobachtete, daß die schnelle i.v. Injektion von Adrenalin eine kurzdauernde Vermehrung der Blutfülle der Nieren hervorrief, auf die eine langdauernde, über mehrere Minuten anhaltende Blutleere folgte. Während wir in den meisten Versuchsgruppen akute Veränderungen (d. h. die erste Phase der Adrenalinwirkung) beobachteten, mag die zweite Phase bei einer Dauersekretion von Adrenalin aus dem Nebennierenmark überwiegen. Diese mag für die geringe Blutfülle der Nieren normaler Tiere verantwortlich sein. Ein Fortfallen der Dauersekretion nach Adrenalektomie könnte die vermehrte Blutfülle der Nieren

adrenalektomierter Tiere erklären. Sie könnte andererseits auch dadurch bedingt sein, daß die operativen Manipulationen bei der Adrenalektomie die Blutverteilung in den Nieren veränderten. Friedmann u. a. beobachteten kürzlich an Hunden, daß operatives Vorgehen in der Nähe der Nieren die Durchblutung dieser Organe herabsetzte. Eine verminderte Durchblutung mag durch Stase im venösen Gebiet bei vermindertem Gefäßtonus zu einer verstärkten Blutfülle führen.

Inwiefern exogenes oder endogenes Adrenalin oder Nor-Adrenalin die Funktion der Niere zu beeinflussen vermag, kann auf Grund der Befunde nicht beurteilt werden. Sie bestätigen jedoch keinesfalls die von Frey (1951) postulierte Unwirksamkeit des Adrenalins auf die Nierengefäße.

Die Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß eine Erregung des sympathischen Systems durch die Ausschüttung von Sympathin aus den Nebennieren eine Verstärkung der Blutfüllung der Nieren hervorruft. Ein Einfluß der sympathischen Innervation der Nieren, d. h. eine lokale Freisetzung von Nor-Adrenalin, konnte dagegen in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden, da sich die adrenalektomierten Tiere nach Schmerzreiz und während des Asphyxiestadiums der Äthernarkose nicht von ihren (adrenalektomierten und nicht erregten) Kontrollen unterschieden.

Summary

The influence of activation of the sympathetic system on the blood pressure and on the filling of the blood vessels of the kidney has been studied in mice. The blood pressure was recorded on the smoked drum, and histological sections of the cortex of kidneys were photographed after staining with benzidine. 6 independent observers divided all photographs into 4 groups according to the filling of the blood vessels of the cortex of the kidney (Fig. 1). The average filling of the blood vessels was then calculated statistically for every group of experiments.

Intravenous injections of adrenaline and noradrenaline were found to increase the filling of the blood vessels of kidneys. Activation of the sympathetic system was caused either by pain (pinching of the tail) or by administering ether until asphyxia was obtained. Under these conditions an extreme filling of the blood vessels of the kidney was observed.

The adrenal glands were found to be responsible for this reaction, since it was absent in adrenalectomized animals. The sympathetic innervation of the kidney did not seem to take part in this reaction, as the kidneys of "activated" adrenalectomized animals did not differ from adrenalectomized controls.

A rise of blood pressure was observed under these conditions; it was reduced or abolished after adrenalectomy.

Literatur

Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers. Edinburgh: Oliver and Boyd 1950. — Friedman, S. M., R. W. Radcliffe, J. E. H. Turpin and C. L. Friedman: Reflex Anuria in the Dog. Canad. J. of Biochem. a. Physiol. **34**, 158 (1956). — Frey, E.: Nierentätigkeit und Wasserhaushalt. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951. — Jungblut, P.: Die Wirkung von einmaligen intravenösen Adrenalininjektionen auf die Nierengefäße der Maus. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 154 (1955a); **225**, 191 (1955b). — Jungblut, P., u. G. Kuschinsky: Eine Methode zur Beurteilung des Nierengefäßtonus bei Mäusen. Das Verhalten der Nierengefäße der Mäuse in den verschiedenen Stadien der Äthernarkose. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 533 (1955). — Kuschinsky, G., u. H. Vorherr: Über eine einfache rußkymographische Methode zur fortlaufenden Blutdruckmessung an Mäusen und Ratten. Experientia (Basel) **13**, 298 (1957). — Slonimsky, P., u. M. Cunge: Ein neues Verfahren der elektiven Färbung der Blutgefäße im Zentralnervensystem. Folia morph. (Warzawa) **7**, 126 (1937); zit. n. Zbl. Neur. **87**, 561 (1938). — Snedecor, G. W.: Statistical Methods. The Iowa State College Press 1950.

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Pharmakolog. Institut der Universität Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 488—495 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Die Verstärkung der Acetylcholinwirkung auf die quergestreifte Skeletmuskulatur durch Austausch des extracellulären Natriumchlorids gegen Natriumsulfat, Natriumnitrat, Natriumbromid und Saccharose

Von
H. Stormann, O. Kraupp, B. Pillat und P. H. Clodi

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Juli 1957)

Ein Austausch der extracellulären Chloridionen durch verschiedene „Fremdanionen" wie Sulfat, Nitrat, Bromid, Jodid oder Thiocyanat verursachte eine Reihe von Veränderungen an der Muskelmembran: So konnte eine Störung der Kaliumverteilung (Kraupp et al. 1957), das Auftreten einer Membrandepolarisation (Giebisch et al., Harris u. Martins Ferreira, Etzensperger u. Bretonneau) sowie eine Verlängerung der elektrischen Zeitkonstante bzw. des elektrischen Widerstandes der Membran (Hutter u. Padsha, Padsha) unter der Einwirkung der oben angeführten Fremdanionen beobachtet werden. Zweifelsohne als Folge dieser Membranstörungen wurden auch von einer Reihe von Autoren Veränderungen des zeitlichen Ablaufes der Kontraktion nach Einzelreizung unter denselben Bedingungen festgestellt (Kahn u. Sandow 1950, Kahn u. Sandow 1951, Hill u. Macpherson, Ritchie, Sandow u. Mauriello).

Diese Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit durch eine Untersuchung der Wirkung von Sulfat- bzw. Nitrat- und Bromidionen auf die Kontraktur- und kaliumfreisetzende Wirkung des Acetylcholins (ACh) an der isoliert durchströmten innervierten sowie chronisch denervierten Katzenmuskulatur ergänzt.

Methodik

Die Versuche wurden an Katzen beiderlei Geschlechts (Gewicht 1,8—2,7 kg; Chloralose-Narkose: 80 mg/kg) durchgeführt. Bezüglich der Einzelheiten der Durchströmungsanordnung sowie der Zubereitung der die verschiedenen Anionen enthaltenden Durchströmungsflüssigkeiten verweisen wir auf frühere Arbeiten (Kraupp et al. 1957, Giebisch et al.). Die Veränderungen des mechanischen Spannungszustandes der Muskulatur wurden isometrisch mittels Dehnungsmeßstreifen in der bei Kraupp et al. 1956 genau angegebenen Weise registriert. Die

Kaliumkonzentrationen in der ein- und ausströmenden Flüssigkeit wurden mittels des Beckman-Flammenphotometers bestimmt. Die Berechnung der nach intraarterieller Verabreichung von ACh zusätzlich aus der Muskulatur freigesetzten Kaliummengen erfolgte in derselben Weise wie bei Kraupp et al. 1955a. Die einzelnen ACh-Dosen wurden intraarteriell in den Zuführungsschlauch zur Aorta injiziert, und die Aufteilung der Dosen auf die beiden Extremitäten aus dem jeweiligen Durchströmungsverhältnis errechnet. In einigen Versuchen war eine der beiden Extremitäten durch Durchschneidung der Nn. ischiadicus und femoralis 8—14 Tage vor der Durchführung des Versuches chronisch denerviert worden.

Ergebnisse

1. Veränderungen nach teilweisem Austausch der extracellulären Chloridionen durch Sulfationen. Insgesamt wurden 4 Durchströmungsexperimente durchgeführt, wobei durchwegs die Chloridionenkonzentration nach einer kurzen normalen Vorperiode auf einen Wert von etwa 30 mM/l erniedrigt und durch 55 mM/l Sulfat ersetzt worden war. In 3 Versuchen war eine der beiden Extremitäten chronisch denerviert worden. Führung und Verlauf eines solchen typischen Experimentes können aus Abb. 1 ersehen werden. Als wesentlichste Ergebnisse dieser Versuchsserie lassen sich die folgenden Befunde hervorheben:

a) Abschwächung der „Sulfatkontraktur" durch die chronische Denervierung. In allen 3 Experimenten, in denen die Wirkungen der Sulfationen an der innervierten und chronisch denervierten Extremität vergleichend untersucht wurden, zeigte der chronisch denervierte M. gastrocnemius unmittelbar nach der Umschaltung eine wesentlich geringere mechanische Spannungszunahme als der kontralaterale innervierte Muskel (siehe Abb. 1, 2. und 4. Reihe). Dies konnte nicht auf eine Atrophie durch die chronische Denervierung zurückgeführt werden, da in allen 3 Versuchen die mechanische Ansprechbarkeit des Muskels auf intraarteriell verabreichtes ACh nach wie vor voll erhalten war.

b) Steigerung der Kontrakturwirkung des ACh am innervierten Muskel. Wie zunächst aus der Abb. 1 (1. und 2. Reihe) ersehen werden kann, führte die intraarterielle Verabreichung von ACh in Dosen, die vorher überhaupt keine Wirkung am innervierten Muskel gezeigt hatten, etwa 20—30 min nach der Umschaltung auf die chloridarme, sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeit nunmehr zum Auftreten von Kontrakturen. Höhe und Dosisabhängigkeit dieser Kontrakturen entsprachen den analogen Spannungsänderungen, die am denervierten Muskel unter normaler Durchströmung bei der gleichen ACh-Dosierung auftraten (Abb. 1, 2. und 4. Reihe). In Abb. 4 (volle Kreise) sind die maximalen Spannungszunahmen des innervierten Gastrocnemius unter den Bedingungen der Sulfatdurchströmung in Abhängigkeit von der intraarteriellen ACh-Dosis aufgetragen. Ein Vergleich der unter Sulfatdurchströmung gemessenen Werte in Abb. 4 mit der Schwellendosis des

normal durchströmten Muskels (großer senkrechter Pfeil in Abb. 4 etwa bei 10 μM, Kraupp et al. 1956) ergibt eine etwa 1000fache Steigerung der Empfindlichkeit des M. gastrocnemius gegenüber der kontrakturauslösenden Wirkung des ACh durch die Sulfatdurchströmung. Dies

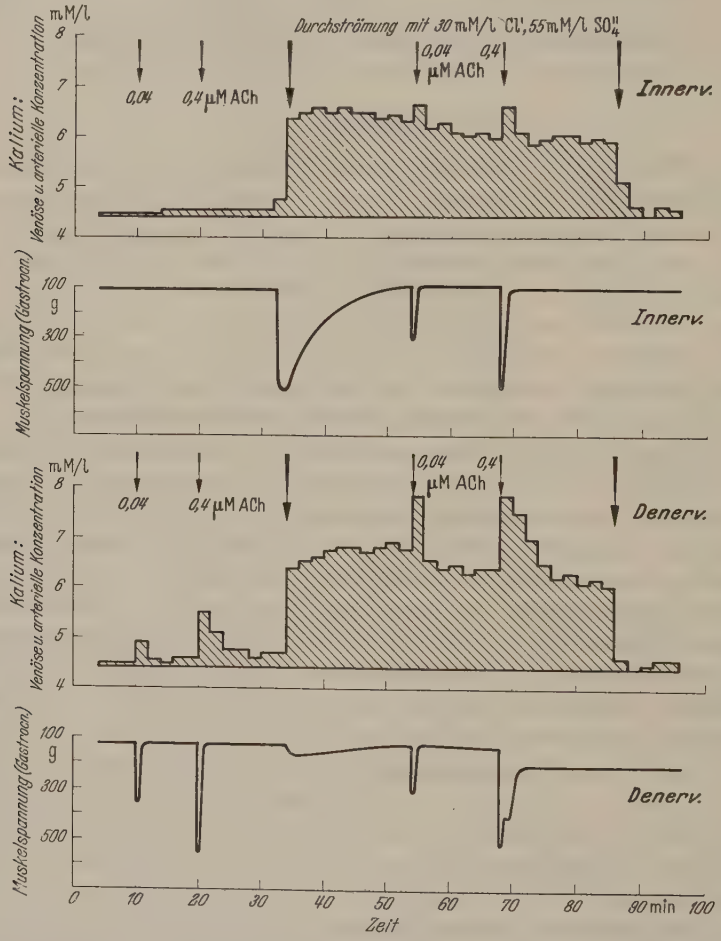


Abb. 1. Venöse und arterielle Kaliumkonzentrationen sowie mechanischer Spannungsverlauf des M. gastrocnemius an einer innervierten sowie chronisch denervierten isoliert durchströmten hinteren Katzenextremität. Zwischen beiden großen Pfeilen: Durchströmung mit 30 mM/l Cl und 55 mM/l SO_4; kleine Pfeile: Intraarterielle Acetylcholindosen. Abszisse: Zeit in Minuten

entspricht etwa der Empfindlichkeitssteigerung durch chronische Denervierung.

Am chronisch denervierten Muskel konnte hingegen kein signifikanter Einfluß der extracellulären Anwesenheit von Sulfationen auf die kontrakturauslösende Wirkung des ACh beobachtet werden.

c) Beeinflussung der durch ACh hervorgerufenen Kaliumfreisetzung aus der Muskulatur. Wie bereits mehrfach berichtet (Kraupp et al. 1957, Giebisch et al.), bewirkt die Umschaltung auf eine chloridarme, sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeit eine dauernde Erhöhung der Spontanfreisetzung von Kaliumionen aus der Muskulatur. Dieser Effekt ist an der innervierten und chronisch denervierten Muskulatur annähernd gleich ausgeprägt (siehe Abb. 1, 1. und 3. Reihe). Eine

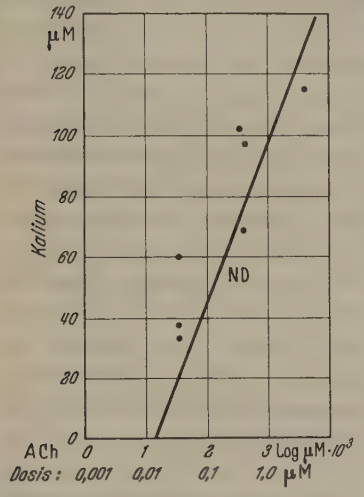


Abb. 2

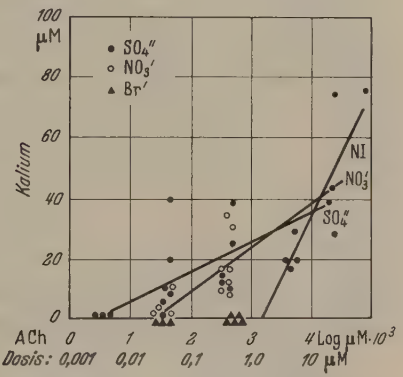


Abb. 3

Abb. 2. Kaliumfreisetzung nach intraarterieller Verabreichung von ACh an einer chronisch denervierten hinteren Katzenextremität bei Durchströmung mit 30 mM/l Cl und 55 mM/l SO_4 (Punkte). *ND* Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung einer normal durchströmten chronisch denervierten hinteren Katzenextremität. Ordinate: Kaliumionen in μM; Abszisse: ACh-Dosen in μM

Abb. 3. Kaliumfreisetzung nach intraarteriellen Dosen von ACh an der innervierten, isoliert durchströmten hinteren Katzenextremität bei Durchströmung mit 30 mM/l Cl und 55 mM/l SO_4 (volle Kreise) bzw. 110 mM/l NO_3 (offene Kreise) bzw. 110 mM/l Br (volle Dreiecke). *NI* Dosis-Wirkungskurve der durch ACh verursachten Kaliumfreisetzung an der normal durchströmten innervierten Muskulatur. Ordinate: freigesetzte Kaliumionen in μM. Abszisse: ACh-Dosis in μM

intraarterielle Verabreichung von ACh führt am normal durchströmten innervierten Muskel ab 1 μM ACh und am normal durchströmten denervierten Muskel ab 0,01 μM ACh zu einer mehrere Minuten lang anhaltenden dosisabhängigen Kaliumfreisetzung (Kraupp et al. 1955a). Unter der Sulfatdurchströmung konnte nun an der innervierten Muskulatur schon bei 100fach geringeren Dosen von ACh eine deutliche Kaliumfreisetzung beobachtet werden (Abb. 3, volle Kreise), wobei jedoch die Dosis-Wirkungskurve dieser Kaliumfreisetzung ungleich flacher als bei normaler Durchströmung verlief (siehe Abb. 3, Vergleich der Geraden SO_4 mit der Geraden *NI*). Empfindlichkeitssteigerung sowie Abflachung der Dosis-Wirkungsrelation erinnern an das Verhalten der eserinisierten Muskulatur (Kraupp et al. 1955b).

An der chronisch denervierten Muskulatur trat durch die Sulfatdurchströmung weder in den Schwellendosen noch im Verlauf der

Dosiswirkungsrelation eine Änderung gegenüber dem Verhalten bei normaler Durchströmung in Erscheinung (Vergleich in Abb. 2, Meßwerte mit Gerader *ND*).

2. Veränderungen nach teilweisem Austausch der extracellulären Chloridionen durch Nitrat- bzw. Bromidionen. Mit beiden Ionenarten wurden je 3 Durchströmungsexperimente durchgeführt, wobei wiederum in allen 6 Versuchen die Chloridionenkonzentration auf einen Wert von 30 mM/l erniedrigt und durch 110 mM/l Nitrat bzw. Bromid ersetzt worden war. Versuche mit denervierten Extremitäten wurden nicht durchgeführt. Es konnten folgende Befunde erhoben werden:

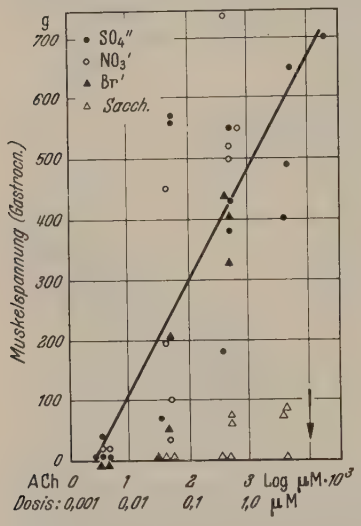


Abb. 4. Maximale isometrische Spannungszunahme des normal innervierten M. gastrocnemius einer isoliert durchströmten hinteren Katzenextremität nach intraarterieller Injektion verschiedener Dosen von ACh. *a* Bei Durchströmung mit 55 mM/l SO_4 (volle Kreise), *b* 110 mM/l NO_3 (offene Kreise), *c* 110 mM/l Br (volle Dreiecke) und *d* 220 mM/l Saccharose (offene Dreiecke) (in allen Versuchen: 30 mM/l Cl). Die Gerade gibt die gemeinsame Regressionslinie der SO_4, NO_3 und Br-Versuche wieder. Der senkrechte Pfeil gibt die Dosisschwelle an der normal durchströmten hinteren Katzenextremität an

a) Wie bereits berichtet (Kraupp et al. 1957), kam es in keinem der Experimente nach Umschaltung auf die fremdanionhaltige Lösung zum Auftreten einer Spontankontraktur des Gastrocnemiusmuskels.

b) Wie aus der Abb. 4 ersehen werden kann, trat bei Durchströmung mit Nitrat bzw. Bromid (100 mM/l) eine ähnliche Steigerung der Kontrakturwirkung des ACh in Erscheinung wie unter Sulfatdurchströmung (Abb. 4, offene Kreise, ausgefüllte Dreiecke). Eine gemeinsame statistische Behandlung der Sulfat-, Nitrat- und Bromidversuche ergab die in Abb. 4 eingezeichnete Regressionsgerade der Dosis-Wirkungsbeziehung der kontrakturauslösenden Wirkung des ACh unter den drei Durchströmungsbedingungen. Aus dem Abstand des Schnittpunktes dieser Geraden mit der Abszisse von der Schwellendosis des normal durchströmten Muskels kann wieder die 1000fache Empfindlichkeitssteigerung gegenüber ACh durch Einwirkung der 3 genannten Fremdanionen abgelesen werden.

c) Bei Durchströmung mit nitrathaltiger Tyrodelösung trat eine ähnliche Steigerung der Kaliumfreisetzung durch ACh wie bei den Sulfatversuchen in Erscheinung (Abb. 3, leere Kreise und Gerade NO_3). Hingegen konnte keine solche Steigerung bei Durchströmung mit Bromid erreicht werden (Abb. 3, volle Dreiecke).

3. Veränderungen nach teilweisem Austausch des extracellulären Natriumchlorids durch Saccharose. Im Gegensatz zu den unter 1 und 2 berichteten Versuchsreihen wurden in den vorliegenden Versuchen außer der Chloridkonzentration auch die Natriumkonzentration auf etwa 30 mM/l gesenkt und durch Saccharose ersetzt. Über die Erhöhung der Kaliumspontanfreisetzung sowie die Erniedrigung der durch ACh hervorgerufenen zusätzlichen Kaliumfreisetzung unter diesen Versuchsbedingungen wurde bereits früher berichtet (KRAUPP, KRAUPP et al. 1957). In den vorliegenden Versuchen konnten wir zusätzlich finden, daß bei Durchströmung mit Saccharose-Tyrode eine geringgradige Steigerung der kontrakturauslösenden Wirkung des ACh gegenüber Versuchen mit normaler Durchströmung in Erscheinung trat (Abb. 4, leere Dreiecke). Diese Steigerung war jedoch um vieles schwächer ausgeprägt als bei den Versuchen, bei denen nur das Chloridion gegen ein Fremdanion ausgetauscht, die Natriumkonzentration jedoch unverändert gehalten worden war.

Schlußbetrachtung

Das wesentlichste Ergebnis der hier mitgeteilten Untersuchungen ist die außerordentlich starke Steigerung der kontrakturauslösenden Wirkung des ACh an der innervierten quergestreiften Muskulatur durch Ersatz der extracellulären Chloridionen durch Sulfat, Nitrat oder Bromid. Diese Steigerung entspricht in ihrem Ausmaß der Potenzierung durch chronische Denervierung, von der sie sich aber dadurch scharf unterscheidet, daß keine gleichartige Potenzierung der kaliumfreisetzenden Wirkung des ACh in Erscheinung tritt. Dies spricht dafür, daß durch die Anwesenheit der Fremdanionen weniger Intensität und Zeitdauer der Endplattenwirkung des ACh, sondern eher die Weiterleitung der durch die ACh-Wirkung hervorgerufenen Membranveränderungen auf das kontraktile System beeinflußt werden. Ganz ähnliche Verhältnisse lagen auch bei Herabsetzung der extracellulären Calciumkonzentration vor (KRAUPP et al. 1956). Als ursächliche Momente für eine solche Veränderung der Weiterleitung auf das kontraktile System müssen hier vor allem die unter Einwirkung von Fremdanionen beobachteten Veränderungen der elektrischen Membraneigenschaften wie Senkung des Ruhepotentials (GIEBISCH et al., HARRIS u. MARTINS FERREIRA), Erhöhung des elektrischen Membranwiderstandes (PADSHA) und Verlängerung des negativen Nachpotentials (ETZENSPERGER u. BRETONNEAU) herangezogen werden. Interessanterweise wurde in unseren Versuchen die ACh-Wirkung auf die chronisch denervierte Muskulatur durch den Austausch von Chloridionen gegen Fremdanionen kaum beeinflußt; dies spricht möglicherweise dafür, daß die Weiterleitung der ACh-Depolarisation auf das kontraktile System am denervierten Muskel bereits maximal ist und durch die den Anionenwirkungen zugrunde liegenden Mechanismen

nicht mehr weiter gesteigert werden kann. Im Falle der „Sulfatkontraktur" trat sogar eine Herabsetzung der mechanischen Erregbarkeit durch die chronische Denervierung in Erscheinung.

Summary

On isolated perfused hind limbs of cats the influence of replacement of extracellular sodium chloride by sodium sulfate, -nitrate, and -bromide and by saccharose upon the action of acetylcholine on the striated muscle was investigated. In some experiments the reactions of normal innervated and chronically denervated muscles were compared in the same animal. The following results were obtained:

1. Replacement of 110 mM/l chloride by 55 mM/l sulfate or 110 mM/l nitrate or bromide in the perfusion fluid led to an thousandfold increase in sensitivity of the innervated muscle to the mechanical action (contracture) produced by acetylcholine. However there was no such increase in sensitivity with the chronically denervated muscle.

2. Replacement of 110 mM/l sodium chloride by saccharose did only sligthly increase the action of acetylcholine (contracture) on the innervated muscle.

3. The potassium release following intraarterial injections of acetylcholine was moderately enhanced for the innervated muscle by partial replacement of the extracellular chloride by sulfate and nitrate. However on the denervated muscle the potassium release following acetylcholine was not influenced by extracellular anion exchange.

Literatur

Etzensperger, J., et Y. Bretonneau: Potential consécutif et durée de l'état actif de la fibre musculaire striée. Action des ions NO_3, Br et I. C. r. Soc. Biol. (Paris) **150**, 1777—1781 (1956). — Giebisch, G. O. Kraupp, B. Pillat u. H. Stormann: Der Ersatz von extracellulärem Natriumchlorid durch Natriumsulfat bzw. Saccharose und seine Wirkung auf die isoliert durchströmte Säugetiermuskulatur. Pflügers Arch. (im Druck). — Harris, E. J., and H. Martins Ferreira: Membrane potentials in the muscles of the South American frog Leptodactylus ocelatus. J. of Exper. Biol. **32**, 539—546 (1955). — Hill, A. V., and L. Macpherson: The effect of nitrate, iodide and bromide on the duration of the active state in skeletal muscle. Proc. Roy. Soc. **143** B, 81—102 (1955). — Hutter, O., and S. M. Padsha: The effect of nitrate on the electrotonic potential of muscle. J. of Physiol. **132**, 32P (1956). — Kahn, A. J., and A. Sandow: The potentiation of muscular contraction by the nitrate ion. Science (Lancaster, Pa.) **112**, 647—649 (1950). — Effects of anions on the mechanical responses of skeletal muscle. Federat. Proc. **10**, 71 (1951).— Kraupp, O.: Elektrolytverschiebungen in der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur durch Acetylcholin bei Durchströmung mit natriumchloridarmer Blut-Tyrode-Lösung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 271—287 (1956). — Kraupp, O., G. Werner, W. Kobinger u. H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Acetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 301—318

(1955a). — Kraupp, O., W. Kobinger, H. Stormann u. G. Werner: Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 403—416 (1955b). — Kraupp, O., H. Stormann, B. Pillat u. P. H. Clodi: Kontraktionsverlauf und Kaliumfreisetzung durch Acetylcholin an der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 419—431 (1956). — Kraupp, O., B. Pillat, H. Stormann u. P. H. Clodi: Der Einfluß des Ersatzes der extracellulären Chlorionen durch Saccharose bzw. SO_4-, NO_3- und Br-Ionen auf Kontraktionszustand und Spontan-Kaliumfreisetzung an der Säugetiermuskulatur. Biochem. Z. **329**, 209—221 (1957). — Padsha, S. M.: The influence of anions on the membrane resistence of skeletal muscle. J. of Physiol. **137**, 26—28P (1957). — Ritchie, J. M.: Effects of nitrate on the active state of muscle. J. of Physiol. **126**, 155—168 (1954). — Sandow, A., and J. E. Mauriello: Force-velocity relation of nitrate treated muscle. Federat. Proc. **12**, 123 (1953).

Dr. H. Stormann, Pharmakologisches Institut der Universität, Wien IX/71, Währinger Straße 13a

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 221, S. 496—506 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler)

Die Leistungsreserve des hypothermen Herzmuskels am Herz-Lungen-Präparat der Ratte

Von
W. Kukovetz

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Juli 1957)

Über die Leistungsfähigkeit des Herzens bei Unterkühlung herrscht noch wenig Klarheit. Untersuchungen an unterkühlten Hunden ergaben eine Verminderung der Arbeitsleistung und des Wirkungsgrades des linken Ventrikels, eine Reduktion des Glucoseverbrauches und auch eine Verminderung der Coronardurchblutung (Edwards u. Mitarb. 1954). Man führte dieses Verhalten auf eine Verlängerung der Kontraktionszeit („activity phase") des Herzmuskels, auf die Blutdrucksenkung und die Zunahme der Blutviscosität zurück (Hegnauer u. Mitarb. 1950). Neil (1956) schloß aus diesen Befunden auf eine Verminderung der Fähigkeit des Herzens, aerobe Energie in mechanische Arbeit umzuwandeln; die gleichzeitige Reduktion der unter Hypothermie vom Herzmuskel zu leistenden Arbeit könnte erklären, daß es trotz dieser Veränderungen selbst bei Unterkühlung auf Temperaturen unter 20° C nicht zum Auftreten einer Insuffizienz kommt (Berne 1953). Es lag jedoch nahe anzunehmen, daß das Herz in Hypothermie mit geringerer Kraftreserve arbeite als bei normaler Körpertemperatur, was Reissmann u. Kapoor (1956), die diese Meinung vertraten, nach Belastungsversuchen am Herz-Lungen-Präparat (HLP) des Hundes bestätigen konnten.

Demgegenüber stehen die Befunde von Anrep u. Häusler (1929), die eine fördernde Wirkung der Unterkühlung auf den Coronardurchfluß am Hunde-HLP beobachteten, Penrod (1951), der zeigen konnte, daß die Sauerstoffversorgung des Herzens bei unterkühlten Hunden nicht gefährdet ist, und Reissmann u. van Zitters (1956), die eine Steigerung des Wirkungsgrades des Herzmuskels am Hunde-HLP fanden.

Die Bestimmung der Leistungsreserve des Herzens während Unterkühlung mittels der maximalen Belastbarkeit, die wir verwendeten, erschien uns auch noch deshalb von Wichtigkeit, weil wir aus den zitierten Befunden den Eindruck gewannen, daß dieses Problem möglicherweise noch eine andere als die genannte Klärung erfahren könnte.

Vor allem lag es aber in unserem Bestreben zu erfahren, ob das Rattenherz, das ja durch seinen histologischen Aufbau und sein Verhalten gegen Herzglykoside eine besondere Stellung einzunehmen scheint (Hoffmann u. Wienke 1953), auch in diesen Belangen ein anderes Verhalten zeigt.

Während die genannten Ergebnisse durchwegs an Hunden gewonnen wurden, versuchten wir der Klärung dieser Frage am HLP der Ratte näherzukommen, das, wie wir fanden, für solche Problemstellungen durchaus geeignet ist und neben anderen Vorteilen den der Billigkeit und leichten Durchführbarkeit hat.

Methodik

Vorbereitung der Tiere. Die Versuche wurden mit männlichen, 250—300 g schweren Albinoratten durchgeführt. Das Versuchstier wurde nach der von Gjaja u. Andjus (1949) angegebenen Methode bis zu Kerntemperaturen von 12—15° C unterkühlt. Statt in Eiswasser setzen wir die nassen, in Litergefäße eingeschlossenen Ratten in einen Kühlschrank bei —8° C. In beiden Fällen war der gewünschte Temperaturabfall nach $1^1/_2$ bis 2 Std erreicht. Die Präparation erfolgte in der von Begovic u. Stern (1953) angegebenen Weise; nur fanden wir es vorteilhafter, den Stamm der V. cava cran. sin. proximal von seiner Aufzweigung zu unterbinden, weil sich dadurch die Ligatur des Nebenastes erübrigt. Eine Verletzung der Pulmonalvenen sahen wir bei diesem Vorgehen nie. Die für die Füllung der Apparatur erforderliche Blutmenge von 20 ml wurde von 3—4 kleineren Tieren gewonnen und mit 5 ml einer 1%igen Kochsalzlösung, der 5000 i.E. Heparin zugesetzt wurden, verdünnt. Eine etwas höhere Ausbeute an nach Dekapitation gewonnenem Blut bekommt man, wenn man den Spendertieren einige Minuten vor der Dekapitation 5 mg Heparin[1] in 1—2 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Schwanzvene injiziert.

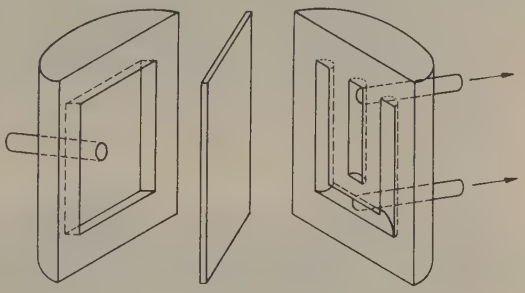


Abb. 1. Schema des peripheren Widerstandes (vgl. Text)

Apparatur[2]. Der periphere Widerstand (Abb. 1) bestand aus zwei zueinander passenden und miteinander verschraubten Zylinderhälften aus Plexiglas, die jedoch durch eine Gummimembran voneinander getrennt waren. In die eine Hälfte war eine Druckkammer eingelassen und diese mit einer durch ein Schraubventil verschließbaren Zuführung versehen. Mit einer Injektionsspritze konnte die Kammer und damit die Gummimembran unter Druck gesetzt werden, der an einem im Nebenschluß angebrachten Hg-Manometer abzulesen war. Das Blut gelangte durch eine

[1] Für die Überlassung von Heparin Novo sind wir der Fa. Novo, Kopenhagen, sehr zu Dank verpflichtet.

[2] Herrn F. Lex, Institutsmechaniker, sei für die Mithilfe bei der Planung sowie für die sorgfältige Anfertigung der Stromuhr und des peripheren Widerstandes an dieser Stelle noch besonders gedankt.

Zuführung in eine U-förmige Rinne der anderen Zylinderhälfte und hatte den Widerstand der Membran zu passieren, um in die zentral gelegene Abflußrinne zu gelangen.

Die fortlaufende Messung der Durchflußmenge erfolgte mit Hilfe einer nach dem Wasserradprinzip arbeitenden, ebenfalls aus Plexiglas hergestellten Stromuhr. Sie bestand aus einem zylindrischen Gehäuse, in dem die von der Zuführung abfallenden Bluttropfen ein mit tangentialen Bohrungen versehenes Wasserrad bewegten, dessen Achse in Rubinlagern ruhte. Ein über dem Ausfluß angebrachtes, etwas gebogenes Plättchen aus Plexiglas ermöglichte die Abnahme der Tropfen über einen Blutfilm von annähernd konstanter Größe. Die Umdrehungen des Rades wurden in einem Verhältnis von 1:9,4 übersetzt. Jede Umdrehung des 2. Zahnrades schloß einen Kontakt. Die Abstände zwischen den Kontakten wurden mit einem Zeitordinatenschreiber (Lembeck 1954) registriert.

Die Einstellung der verschiedenen für unsere Untersuchungen gewählten Heiztemperaturen (37°, 32°, 27°, 22° C) geschah durch zwei Thermostatenkreisläufe. Diese führten sowohl durch den doppelwandigen Zuleitungsschlauch bis zu der in die untere Hohlvene eingebundenen und mit einem Thermometer versehenen Kanüle als auch durch den Mantel des venösen Vorratsgefäßes, so daß einwandfreie Temperaturkonstanz und rasches Umschalten gewährleistet waren. Bei Umschaltung vom einen auf den anderen Thermostatenkreislauf dauerte die Umstellung des Herzens auf eine andere Temperaturstufe bei einer Differenz von 5° C, wie wir sie für diese Versuchsreihe meistens verwendeten, etwa 7—10 min. Alle blutführenden Schlauchverbindungen bestanden aus PVC. Der Blutdruck wurde im Nebenschluß zum arteriellen Schenkel des künstlichen Kreislaufes mit einem Hg-Manometer nach Condon (1951) gemessen.

Versuche

Das Starlingsche Herzgesetz diente als Grundlage für die Bestimmung der maximalen Herzleistung bei Temperaturen von 37°, 32°, 27° und 22° C. Es wurde einerseits bei konstantem peripherem Widerstand das *venöse Angebot* durch stufenweise Hebung des venösen Vorratsgefäßes um je 10 mm/45 sec erhöht, wofür Abb. 2 als Beispiel gelten mag, andererseits bei konstantem venösem Angebot der *periphere Widerstand* um je 10 mm Hg/45 sec gesteigert, wozu Abb. 3 eine typische Kurve darstellt. Als Kriterium für die maximale Leistung des Herzens bei venöser Belastung wurde dabei jene Höhe der venösen Blutsäule gewählt, bei welcher sich gerade noch eine Steigerung des Minutenvolumens zeigte. Praktisch gingen wir dabei so vor, daß wir bis zu einer Stufe belasteten, bei der es eben zu einer Wiederabnahme der Förderleistung, gewöhnlich verbunden mit einem Abfall des Blutdruckes, kam, und konnten so die vorhergehende Stufe als Höchstwert (V_{max} in mm H_2O) festsetzen. In analoger Weise wurde die Grenze der Belastbarkeit des Herzens durch Erhöhung des peripheren Widerstandes (W_{max} in mm Hg) mit jenem Druck im peripheren Widerstand festgesetzt, bei dem die Förderleistung gerade noch nicht abnahm. Diese Grenze ließ sich mit der gleichen Methode der Überlastung um eine Stufe, bei der es zu keiner weiteren Zunahme, sondern schon zur Abnahme des Durchflusses kam, die auch meistens mit einem Blutdruckabfall einherging, ebenso

eindeutig bestimmen. Eine Schwierigkeit bei diesem Vorgehen lag in dem allmählichen, auch am unbelasteten Präparat zu beobachtenden Absinken des Minutenvolumens und des Blutdruckes.

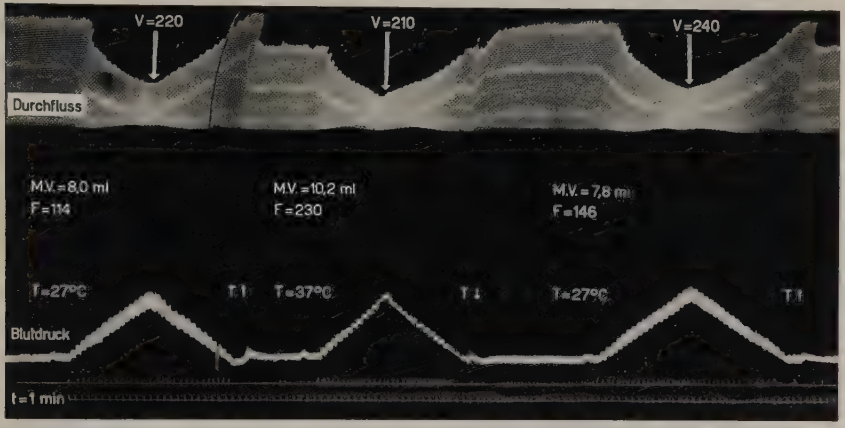


Abb. 2 (Versuch Nr. 43, Tab. 1). Maximale venöse Belastbarkeit des Rattenherzmuskels bei 27° und 37° C. Oben: Durchfluß, Abfall der Kurve bedeutet Durchflußsteigerung; Pfeile: Durchflußverminderung bei Überschreitung der Leistungsgrenze nach stufenweiser Hebung des venösen Vorratsgefäßes. Unten: Blutdruck; der bei 37° C ermittelte Wert (V_{max} = 200 mm Hg) wurde mit den bei der 1. und 3. Bestimmung ermittelten Werten bei 27° C „eingerahmt"

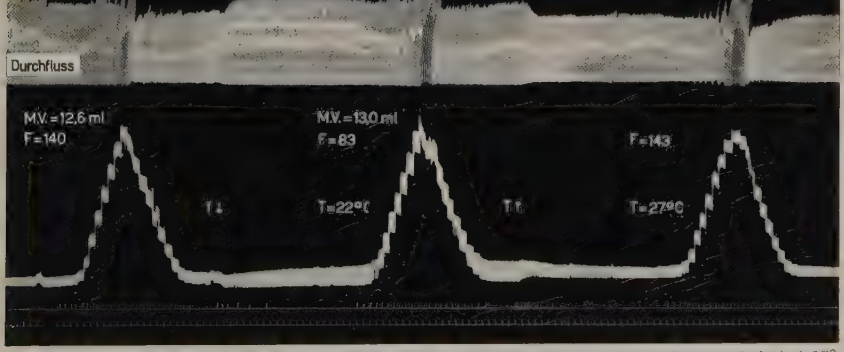


Abb. 3 (Versuch Nr. 55, Tab. 2). Maximale arterielle Belastbarkeit des Rattenherzmuskels bei 27° und 22° C. Gleiche Anordnung wie in Abb. 2. Pfeile: Durchflußverminderung bei Überlastung nach Erhöhung des peripheren Widerstandes. „Einrahmung" wie in Abb. 2

Diese Leistungsabnahme führte in Kontrollversuchen, in denen wir das Herz bei einem peripheren Widerstand von 40 mm Hg und einem venösen Druck von 70 mm H_2O ohne Belastung bei einer Temperatur von 37° C schlagen ließen, nach etwa 4 Std zu Lungenödem. Jeder, der am HLP gearbeitet hat, weiß, daß die Herzleistung rascher abnimmt,

wenn man höhere bzw. zu hohe Ausgangsdrucke auf der arteriellen oder venösen Seite verwendet oder sonstwie zusätzlich zu stark belastet. So teilten auch kürzlich v. Bubnoff u. Mitarb. (1956) mit, daß eine starke Erhöhung des arteriellen Gegendruckes am HLP der Ratte zu akut einsetzender Linksinsuffizienz und massivem Lungenödem, Erhöhung des venösen Einflußdruckes (Grundhöhe: 12—15 cm, Steigerung auf 20 und 25 cm in Abständen von 2—5 min) nach 25—50 min zu einer Drucksteigerung im rechten Vorhof und zu keiner weiteren Zunahme der Förderleistung („kompensierte Insuffizienz") führte. Ferner kann die von

Tabelle 1. *Einfluß der Unterkühlung auf die maximale Herzleistung bei venöser Belastung am HLP der Ratte.* (V_{max} in mm H_2O)

Versuch Nr.	27°	37°	27°	37°	27°	27° : 37°
30	—	120	150	—	—	>
36	—	150	200	—	—	>
39	250	190	150	—	—	>
40	—	170	150	110	—	>
42	—	—	—	160	170	>
43	210	200	230	—	—	>
45	250	220	240	—	—	>
46	—	140	180	120	—	>

Versuch Nr.	27°	22°	27°	32°	27°	32°	
48	210	200	190	160	190	—	22° = 27° > 32°
50	—	—	220	200	210	—	27° > 32°
52	—	—	—	160	160	130	27° > 32°
56	240	220	200	—	—	—	22° = 27°

Reissmann u. Kapoor (1956) am HLP des Hundes beobachtete Erhöhung des Druckes im rechten Vorhof nach vorausgegangener Belastung bei Hypothermie, also unter ähnlichen Bedingungen, wie sie in unseren Versuchen herrschte, als Beweis für diese Leistungsabnahme gelten. Wir haben deshalb, abweichend von anderen Autoren (v. Haxthausen 1955, v. Bubnoff u. Mitarb. 1956), die Ausgangsdrucke sehr niedrig gewählt (peripheren Widerstand: 40 mm Hg, venösen Druck: 70 mm H_2O). Die einzelnen Belastungsstufen wurden mit 45 sec so kurz wie möglich gehalten, und bei der Beurteilung der Leistungsfähigkeit wurde der jeweils bei einer bestimmten Temperatur ermittelte Wert (W_{max} oder V_{max}) dem Mittelwert aus zwei gleichen Bestimmungen gegenübergestellt, die in gleichen Zeitabständen vorher und nachher, also durch „Einrahmung", bei ein und derselben anderen zu vergleichenden Temperaturstufe gewonnen worden waren, wie das aus den Abb. 2 u. 3 hervorgeht und für sämtliche Versuche in den Tab. 1 u. 2 zusammengefaßt wurde. Die ersten Messungen begannen 10—20 min nach Beendigung der Präparation, für die wir 15—20 min benötigten; nach dieser Zeit war die Herzaktion sehr regelmäßig und die Temperatur des Systems ausgeglichen.

Zuerst wurden immer Frequenz (durch Zählung) und Minutenvolumen (durch Auffangen des Blutes in einem graduierten Zylinder) bestimmt, dann belastet und hierauf auf die nächste Temperatur umgeschaltet. Nach einer Pause von etwa 10 min, die dem Temperaturausgleich diente, wurde der Vorgang auf der neuen Temperaturstufe wiederholt. An einem Präparat konnten bis zu 6 Belastungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden. W_{max} und V_{max} wurden in wechselnder Reihenfolge bei einem Teil der Versuche nacheinander, bei einem anderen Teil

Tabelle 2. *Einfluß der Unterkühlung auf die maximale Herzleistung bei arterieller Belastung am HLP der Ratte.* (W_{max} in mm Hg)

Versuch Nr.	27°	37°	27°	37°	27°	37°	27°	27° : 37°
31	—	70	80	—	—	—	—	>
37	—	120	130	—	—	—	—	>
39	150	100	110	—	—	—	—	>
40	—	110	130	100	—	—	—	>
41	—	90	100	—	—	—	—	>
42	140	130	120	—	—	—	—	=
45	—	—	110	100	100	90	90	>

Versuch Nr.	27°	22°	27°	32°	27°	32°	37°	32°	
49a	110	110	90	—	—	—	—	—	22° = 27°
49b	—	—	—	120	120	110	—	—	27° > 32°
51	—	—	130	120	120	100	90	90	27° > 32° > 37°
55	140	140	140	—	—	—	—	—	22° = 27°

getrennt voneinander bestimmt. Die Reihenfolge der untersuchten Temperaturstufen geht aus der gemeinsamen Betrachtung der Tab. 1 u. 2 unter Berücksichtigung der Versuchszahl hervor.

Ergebnisse

An 24 Ratten-HLP wurde der Einfluß der Unterkühlung auf die maximale Belastbarkeit des Herzmuskels durch arterielle und venöse Drucke untersucht. Wie bereits erwähnt, kommt es nach derartigen Drucksteigerungen auch bei konstanter bzw. bei Körpertemperatur zu einer Abnahme der Herzleistung. Um diese Fehlerquelle möglichst auszuschalten, haben wir in die Tab. 1 u. 2 nur jene 20 Versuche aufgenommen, bei denen entweder die Mittelwerte aus zwei Bestimmungen bei gleicher Temperatur einem zeitlich dazwischenliegenden, bei einer anderen Temperatur gewonnenen Wert gegenübergestellt werden konnten oder wo das W_{max} bzw. V_{max} bei der nachfolgenden Bestimmung höher war, als bei der vorhergehenden. Wie ebenfalls aus Tab. 1 (Versuche 30, 36, 42) und Tab. 2 (Versuche 31, 37, 41) hervorgeht, war dies, in Übereinstimmung mit dem Gesamtresultat, nur dann der Fall, wenn bei der

nachfolgenden Belastung die Temperatur tiefer als bei der vorhergehenden war.

Bei Gegenüberstellung der vom Herzen bewältigten venösen Drucke (Tab. 1) bei 27° und 37° C ergibt sich in allen 8 durchgeführten Versuchen eine höhere Belastbarkeit bei 27° C. In 3 Fällen wurde das V_{max} bei 27° und 32° C verglichen, wobei auch hier noch bei 27° C höhere Werte gefunden wurden. Zwischen 27° und 22° C (2 Versuche) zeigte sich im V_{max} kein Unterschied mehr.

Ähnlich verhielten sich die Herzen bei arterieller Belastung durch Erhöhung des peripheren Widerstandes. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, waren die vom Herzmuskel noch bewältigten Drucke im peripheren Widerstand in 6 von 7 Versuchen bei 27° C größer als bei 37° C, in einem Versuch war das W_{max} gleich groß. Bei 32° C war das W_{max} größer, als bei 37° C (1 Versuch), bei 27° C größer als bei 32° C (2 Versuche) und bei 22° C gleich groß wie bei 27° C (2 Versuche), so daß sich für beide Belastungsarten folgende Beziehung ergibt: $37° < 32° < 27° = 22°$ C.

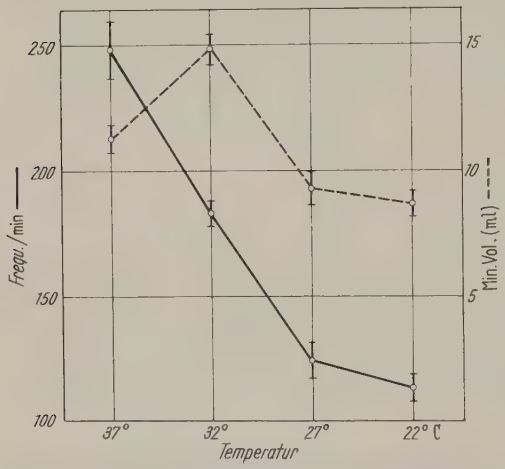


Abb. 4. Mittelwerte von Frequenz (——) und Minutenvolumen (- - - -) des unbelasteten Herzmuskels am HLP der Ratte bei Temperaturen von 37°, 32°, 27° und 22° C

Die Frequenz des unbelasteten Herzens nahm im vorwiegend untersuchten Temperaturbereich zwischen 37° und 27° C, wie das Diagramm der Abb. 4 zeigt, nach vorhergegangener einmaliger Belastung in linearem Verhältnis mit der Temperatur ab, was mit Befunden am HLP des Hundes (Knowlton u. Starling 1912, Taylor 1951, Badeer 1951, Reissmann u. Kapoor 1956) übereinstimmt. Bei 22° C war die Frequenz höher, als es dieser Beziehung entsprechen würde. Dieses Verhalten steht in Einklang mit den Beobachtungen von Grosse-Brockhoff u. Schoedel (1943), die an intakten Hunden zwischen 25° und 22° C ebenfalls einen flacheren Verlauf der Frequenzkurve ermittelten. Die Frequenzkurve des unbelasteten Herzens ohne vorhergehende Belastung zeigt bereits zwischen 32° und 27° C einen etwas flacheren Verlauf.

Das in Abb. 4 dargestellte Diagramm zeigt das Verhalten des Minutenvolumens unter den gleichen Bedingungen wie bei Bestimmung der Frequenz. Hier ergab sich ein neuer, überraschender Befund: Das mittlere

Minutenvolumen war bei 32° C größer als bei 37° C, wobei der Anstieg bei den einmal vorbelasteten Herzen ausgeprägter war als bei den unvorbelasteten. Erst bei 27° C lagen die Minutenvolumswerte tiefer als bei normaler Körpertemperatur.

Besprechung der Ergebnisse

Das verwendete Kriterium zur Bestimmung der maximalen Herzleistung gestattete am HLP der Ratte Untersuchungen über die Belastbarkeit des Herzmuskels und damit Rückschlüsse auf dessen Leistungsreserve bei verschiedenen Graden der Unterkühlung in Form von Vergleichswerten. Auf Grund der Ergebnisse kann gesagt werden, daß der Herzmuskel der Ratte bei Unterkühlung sowohl zu größerer Kraftentwicklung (Überwinden eines höheren peripheren Widerstandes) als auch zu gesteigerter Faserverkürzung (Bewältigung eines größeren venösen Angebotes) befähigt ist als bei normaler Körpertemperatur.

Die Deutung dieser Befunde ist insofern schwierig, als eingehende Untersuchungen über das physiologische Verhalten des Herzmuskels während Hypothermie unseres Wissens bisher an Ratten nicht durchgeführt wurden. Dagegen liegt eine größere Anzahl von Berichten über Unterkühlungsversuche an Hunden vor, und zwar sowohl in vivo als auch am HLP. Analogieschlüsse vom Hund auf die Ratte sind aber nur mit großem Vorbehalt möglich, da gerade das Rattenherz infolge seiner durch besonders schmale Muskelfasern gekennzeichneten histologischen Struktur, seiner höheren Frequenz und, damit zusammenhängend, seiner kurzen Erregungsdauer mit vor allem im Plateauteil verkürztem Ventrikelpotential (Weidmann 1956), seiner Unterempfindlichkeit gegenüber Herzglykosiden (Gunn 1913, Clark 1913, Hoffmann u. Wienke 1953, v. Bubnoff u. Mitarb. 1956) eine besondere Stellung einnimmt.

Frühere Befunde sprachen zunächst dafür, daß Hypothermie zu einem allgemeinen Zustand von Gewebehypoxie, also auch des Herzens führe. Die Verminderung der Dissoziation des Hämoglobins in der Kälte (v. Werz 1943), die Ähnlichkeit der EKG-Veränderungen bei Unterkühlung und bei Sauerstoffmangel (Weiner u. Mitarb. 1949) unterstützten diese Auffassung. Auch Hegnauer, Shriber u. Haterius (1950) traten für die Hypoxietheorie der Unterkühlung ein; sie fanden an unterkühlten Hunden eine Verlängerung der Kontraktionsphase des Herzens und nahmen eine Drosselung des Coronardurchflusses an, die zusammen mit einer Hemmung der Stoffwechselvorgänge zu einer Verminderung der Energiereserven führen sollte. Demgegenüber fand Penrod (1951) keine Veränderung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz in den Coronargefäßen zwischen 38° und 20° C, auch dann nicht, wenn er die Hunde mit reinem Sauerstoff beatmete, also bei Vermehrung des physikalisch gelösten Sauerstoffes im Blut. Diese Beobachtungen waren mit der Annahme eines in Unterkühlung bestehenden Sauerstoffmangels nicht vereinbar. Im gleichen Sinne sind die Ergebnisse von Bigelow u. Mitarb. (1950) zu deuten, wonach Hunde mehrstündige Abkühlung auf 19° C ohne Schädigung überstanden und nach Wiedererwärmung keine wesentliche Steigerung ihres Sauerstoffbedarfes zeigten, unabhängig von der Dauer der vorausgegangenen Unterkühlung. Auch Hegnauer, Flynn u. D'Amato (1951), die Hunde bis zu 16,2° C Herztemperatur unterkühlten, kamen zu ähnlichen Ergebnissen.

Von wesentlichem Interesse für die Deutung unserer Befunde ist der Einfluß der Unterkühlung auf die Coronardurchblutung. Während

Edwards u. Mitarb. (1954) an intakten Hunden eine Verminderung der Coronardurchblutung unter Hypothermie beobachteten, fanden Anrep u. Häusler (1929) am HLP des Hundes eine Steigerung derselben, die auf eine direkte erweiternde Wirkung der Kälte auf die Coronargefäße zurückgeführt wurde. Für ein solches Verhalten in vivo sprechen auch die Beobachtungen von Berne (1954), wonach die Coronardurchblutung bei tiefer Hypothermie größer war, als es der Abnahme des Aortendruckes entsprechen würde; nach Steigerung des Perfusionsdruckes bei einer konstanten Temperatur von 21° C war die Coronardurchblutung bedeutend größer als bei den den angewendeten Drucken entsprechenden höheren Temperaturen. Auch Reissmann u. van Citters (1956) konnten neuerdings eine Zunahme der Coronardurchblutung am Hunde-HLP feststellen, als bei schrittweiser Senkung der Herztemperatur die Arbeitsleistung des Herzens konstant gehalten wurde. Alle diese Beobachtungen lassen es möglich erscheinen, daß unter arterieller und auch venöser Belastung, die ebenfalls, wie Abb. 2 u. 3 zeigen, zu bedeutenden Steigerungen des Aortendruckes führen, die Durchblutung der Coronargefäße bei Unterkühlung sogar größer ist als unter den gleichen Bedingungen bei normaler Körpertemperatur.

Aus den angeführten Befunden geht hervor, daß die Sauerstoffversorgung und die Sauerstoffaufnahme des Herzens unter Hypothermie ausreichend ist und daß eine ausreichende Durchblutung der Coronarien, sowohl in Ruhe als auch unter Belastung des Herzens, angenommen werden muß. Trotz dieser Beweise bestand vor allem mit Rücksicht auf die Ergebnisse von Edwards u. Mitarb. (1954) am intakten Hund Grund zur Annahme, daß die Energiereserve des Herzmuskels bei Unterkühlung geringer sei als bei normaler Körpertemperatur. Es schien also, daß nur durch die gleichzeitige Reduktion der Anforderungen an den Herzmuskel die Entstehung einer Insuffizienz verhindert würde. Reissmann u. Kapoor (1956), die diese Meinung vertraten, haben zur Klärung der Frage Belastungsversuche am HLP des Hundes angestellt: Sie fanden bei vorwiegend venöser Belastung, bei Hypothermie bis zu 22° C herunter, gleichbleibende maximale Schlagvolumina und proportional mit der Frequenz abnehmende maximale Minutenvolumina, also eine gegenüber den Verhältnissen bei Normaltemperatur deutliche Verminderung der Leistungsreserve („work capacity"), die aber im Vergleich zu der vom ruhenden unterkühlten Ganztier geforderten Herzarbeit immer noch beträchtlich groß war. Ein Vergleich dieser mit unseren an der Ratte gewonnenen Ergebnissen ist nicht nur aus den eingangs erwähnten Gründen, sondern auch wegen der verschiedenen Methodik bzw. der zur Bestimmung der maximalen Herzleistung verwendeten Kriterien schwierig. Auch erscheint uns der Umstand wesentlich, daß die genannten Autoren unter den einzelnen Belastungsstufen jeweils 45 min

lang arbeiten ließen, was, zumindest bei der Ratte, leicht zu einer Insuffizienz führen konnte (vgl. v. Bubnoff u. Mitarb. 1956). Zur Ausschaltung dieses Störfaktors haben wir die Dauer der einzelnen Belastungsstufen nur so lange gewählt, daß wir gerade erkennen konnten, ob die betreffende Stufe noch bewältigt wird oder nicht, wofür 45 sec genügten. Die bereits erwähnten Autoren Reissmann u. van Citters (1956) haben am HLP des Hundes auch den Sauerstoffverbrauch und den Wirkungsgrad bei 37° und 27° C bei gleicher Herzarbeit einerseits pro Zeiteinheit, andererseits pro Systole verglichen. Sie fanden den Wirkungsgrad des Herzens unter Hypothermie größer als unter normaler Körpertemperatur. Mit steigender Belastung, sei es der arteriellen oder der venösen Seite, nahm diese Differenz weiter zu. Dies würde bedeuten, daß das Herz unter Hypothermie rationeller arbeitet als bei normaler Temperatur, und zwar um so rationeller, je stärker es belastet wird. Als Ursache für dieses Verhalten machen diese Autoren die Abnahme der Frequenz„ i. e. die ausschließliche Erhöhung des Minutenvolumens durch Vermehrung des Schlagvolumens, und die Reduktion des Ruhestoffwechsels geltend. Auf Grund der angeführten Ergebnisse ist anzunehmen, daß der Herzmuskel bei Unterkühlung ausreichend, bei zusätzlicher Belastung offenbar besser durchblutet ist und daß seine Arbeitsweise („work performance") bei Unterkühlung dynamisch anders, bei Belastung wesentlich rationeller ist als bei normaler Körpertemperatur.

Nach dem Gesagten lassen sich unsere Ergebnisse, nämlich die am HLP der Ratte beobachtete Vergrößerung der Leistungsreserve während Unterkühlung durchaus folgerichtig einordnen, wobei besonders nochmals darauf hinzuweisen ist, daß das Rattenherz wegen seiner hohen Frequenz und der großen Zellzahl pro Raumeinheit den besprochenen Einflüssen in höherem Maße unterliegen dürfte als das Hundeherz.

Summary

The work capacitiy of the heart under different arterial and venous work loads in 24 rat heart-lung-preparations was compared at 37°, 32°, 27° and 22° C. The work capacity was estimated by a stepwise increase of the artificial resistance or the venous inflow load respectively, overloading was indicated by a diminution of output together with a slight fall in blood pressure.

Lowering the temperature was followed by an increase of work capacity and the relation: $37° < 32° < 27° = 22°$ C was obtained by an increase of the artificial resistance as well as of the venous inflow.

The cardiac output under normal work loads after lowering the temperature increased at 32° C and decreased at lower temperatures (27°, 22° C).

Literatur

Anrep, G. V., and H. Häusler: J. of Physiol. **69**, 298 (1929). — Badeer, H.: Amer. J. Physiol. **167**, 76 (1951). — Begovič, S., u. P. Stern: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 333 (1953). — Berne, R. M.: Circulat. Res. **2**, 90 (1953); **2**, 236 (1954). — Bigelow, W. G., W. K. Lindsay, R. C. Harrison, R. A. Gordon and W. F. Greenwood: Amer. J. Physiol. **160**, 125 (1950). — v. Bubnoff, M., J. Krieg u. H. Amiri: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 111 (1956). — Clark, A. J.: J. Pharmacol. **4**, 419 (1913). — Condon, N. E.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 19 (1951). — Edwards, W. S., S. Tuluy, W. E. Reber, A. Siegel and R. J. Bing: Ann. Surg **139**, 275 (1954). — Giaja, J., et R. Andjus: C. r. Acad. Sci. (Paris) **229**, 1170 (1949). — Grosse-Brockhoff, F., u. W. Schoedel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 417 (1943). — Gunn, J. A.: J. Pharmacol. **4**, 225 (1913). — v. Haxthausen, E.: Arzneimittel-Forsch. **5**, 370 (1955). — Hegnauer, H. E., W. J. Shriber and H. O. Haterius: Amer. J. Physiol. **161**, 455 (1950). — Hegnauer, H. E., H. D'Amato and J. Flynn: Amer. J. Physiol. **167**, 63 (1951). — Hoffmann, G., u. H. Wienke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 225 (1953). — Knowlton, F. P., and E. H. Starling: J. of Physiol. **44**, 206 (1912). — Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 50 (1954). — Neil, E.: XXth Internat. Physiol. Congr. Abstr. of Rev. p. 90, 1956. — Penrod, K. E.: Amer. J. Physiol. **164**, 79 (1951). — Reissmann, K. R., and S. Kapoor: Amer. J. Physiol. **184**, 162 (1956). — Reissmann, K. R., and R. L. van Citters: J. Appl. Physiol. **9**, 427 (1956). — Starling, E. H., and S. W. Patterson: J. of Physiol. **48**, 357 (1914). — Taylor, N. B.: J. of Physiol. **71**, 156 (1931). — Weiner, D., K. Lange and M. M. A. Gold: Federat. Proc. **8**, 345 (1949). — Weidmann, S.: Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser, S. 21. Bern: Verl. Hans Huber 1956. — v. Werz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 561 (1943).

Dr. W. Kukovetz, Graz (Österreich), Pharmakolog. Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 507—525 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Pharmakologische Beeinflussung anaphylaktischer Reaktionen an Gefäßpräparaten

Von
G. Engelhardt und G. Hahn

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juni 1957)

Die Versuche, mit einer Reihe Narkotica und Spasmolytica das anaphylaktische Geschehen zu beeinflussen, blieben ohne Erfolg. Mit der Gruppe der Antihistaminica glaubte man, eine weitgehend kausale Therapie anaphylaktischer und allergischer Zustände durchführen zu können.

Der Gedanke, der zur Entwicklung und Prüfung der Antihistaminica führte, ergab sich aus der Annahme, daß das bei der anaphylaktischen und allergischen Reaktion freigesetzte Histamin die wesentlichste Ursache der mannigfaltigen Symptome darstelle.

Der Tod des Meerschweinchens im anaphylaktischen Schock und nach einer großen Gabe von Histamin tritt unter den gleichen Symptomen ein (Auer u. Lewis). Auch an isolierten Organen besteht eine weitgehende Analogie zwischen der Reaktion auf Histamin und der anaphylaktischen Reaktion (Schultz, Dale).

Der direkte Nachweis, daß es tatsächlich unter dem anaphylaktischen Schock zu einer Histaminfreisetzung kommt, wurde erstmalig von Bartosch, Feldberg u. Nagel an der perfundierten Lunge sensibilisierter Meerschweinchen nach Zusatz des Antigens geführt. Katz u. Cohen konnten ähnlich wie im Tierexperiment am Menschen während der anaphylaktischen Reaktion ein Freiwerden von Histamin aus den Blutzellen beobachten. Neuere in vitro-Versuche von Humphrey u. Jaques liefern hierfür eine weitere Stütze.

Trotz des analogen Verhaltens der klinischen Symptome des Histaminschocks und des anaphylaktischen Schocks, des Nachweises der Histaminausschüttung unter der Antigen-Antikörperreaktion aus den Geweben und schließlich der Schutzwirkung, die die Antihistaminica im Tierversuch gegen einige wesentliche Symptome des anaphylaktischen Schocks haben, muß es heute als fraglich erscheinen, ob das Histamin als alleiniger, primärer und ursächlicher Faktor zu gelten hat, oder ob es nicht nur Begleiterscheinung anderer Reaktionen ist (Ratner) und andere Stoffe und Mechanismen gleichzeitig als vermittelnde oder auslösende Ursache beim anaphylaktischen Schock in Frage kommen. Gedacht hat man u. a. an eine Störung des Kalium-Calcium-Gleichgewichtes (Schittenhelm), das Freiwerden von Acetylcholin (Danielopolu; Wenner u. Buhrmester; Went u. Lissák) oder von Eiweißspaltprodukten und proteolytischen Fermenten (Rocha e Silva).

Zu berücksichtigen blieb auch, daß das in der Zelle freiwerdende Histamin vielleicht andere Reaktionsmöglichkeiten besitzt als das von außen zugeführte (Dale 1929, 1948; Schild 1936, 1937).

Tatsache ist, daß die große Gruppe der Antihistaminica in der Therapie anaphylaktischer und allergischer Reaktionen des Menschen und verschiedener Tierarten außer dem Meerschweinchen nicht ganz die Erwartung erfüllt hat, die man bei ihrer Einführung an sie geknüpft hat.

Außer der Einseitigkeit der Histaminhypothese als Grund für das teilweise Versagen der Antihistaminica in der Therapie sind noch andere Momente zu berücksichtigen. Die tierexperimentelle Prüfung der Wirksamkeit der Antihistaminkörper erfolgte in überwiegendem Maße am Meerschweinchen, indem man entweder die Überlebensquote nach einer Antihistaminica-Vorbehandlung unter Antigendisposition am intakten Tier prüfte, oder aber es wurden isolierte Meerschweinchenorgane wie Bronchus, Dünndarmsegment, Uterushorn für die Testung verwendet. Hierbei bewiesen die geprüften Substanzen ihre hohe Wirksamkeit. Führendes Schockorgan des *Meerschweinchens* ist die Lunge, genauer gesagt der Bronchialapparat, — und gerade der Bronchospasmus nach Antigenapplikation wird durch die Antihistaminica günstig beeinflußt. Bei anderen Species liegen die Verhältnisse anders. Beim *Hund* beherrscht im schweren generalisierten Schock eine portale Venensperre das Bild, beim *Kaninchen* eine Vasoconstriction der A. pulmonalis. Bei der Austestung der Antihistaminica gegenüber diesen Symptomen sind die Erfolge schon weniger überzeugend.

Bei den anaphylaktischen und allergischen Reaktionen des Menschen liegen nur noch im seltenen generalisierten Schock die dem Tierversuch vergleichbaren Verhältnisse vor. Ein spezifisches, führendes Schockorgan gibt es beim Menschen nicht. Schockfragmente und Organreaktionen treten auf in Abhängigkeit von der Verteilung des Antigens bzw. Allergens.

Hierbei und bei den Schockfragmenten ist lediglich eine mehr oder minder hochgradige Beteiligung des Gefäßsystems konstant.

Gegen die einseitige und schematisierende Konzentrierung auf ein bestimmtes Schockorgan bei der Deutung einer anaphylaktischen Reaktion im Tierversuch hat Doerr bereits Stellung genommen. Tatsächlich sind bei den verschiedenen Species, auch beim Meerschweinchen, erhebliche Reaktionen des Gefäßsystems zu beobachten.

Die Arbeiten von Airila, Coca, Drinker u. Bronfenbrenner beschreiben die starke Constriction der A. pulmonalis des Kaninchens im Schock. E. Grove konnte an der isolierten A. carotis des Kaninchens eine Vasoconstriction nachweisen. Einen anaphylaktischen Gefäßkrampf im isolierten durchströmten Kaninchenohr beschrieben Friedberger u. Seidenberg, Takasaka, Kritschewski u. Heronimus, Genes u. Dinerstein. Bei mikroskopischer Beobachtung der Ohrgefäße lebender Kaninchen sahen Abell u. Schenk extreme Kontraktionen der Arteriolen.

Eine Constriction der A. pulmonalis des Meerschweinchens unter der Antigen-Antikörperreaktion demonstrierte E. Grove. Burrage u. Irwin verfolgten die Spasmen der Arteriolen und Capillaren im Lungenkreislauf während des Schocks an lebenden Kaninchen und Meerschweinchen mit Hilfe eines Auflichtmikroskops. Eine Verengerung der peripheren Gefäße sensibilisierter Meerschweinchen unter dem Antigenkontakt wiesen an der durchströmten hinteren Körperhälfte Friedberger u. Seidenberg, Takasaka, Kritschewski u. Heronimus nach.

Beim Hund beherrscht das Geschehen am Gefäßapparat das Bild im anaphylaktischen Schock (umfangreiche Literatur siehe bei Doerr).

Die in der Literatur niedergelegten Erfahrungen über die Beeinflussung anaphylaktischer Gefäßreaktionen sind spärlich. Man begnügte

sich durchweg bei der Testung der Antihistaminica mit der Prüfung der Beeinflussung der Histaminreaktion am Kreislauf des intakten Tieres oder an isolierten Gefäßpräparaten.

Für die praktische Therapie erscheint es aber wünschenswert, die Beeinflussung oder Verhütung anaphylaktischer bzw. allergischer Gefäßreaktionen pharmakologisch auch unter vereinfachten Versuchsbedingungen zu prüfen, um insbesondere die quantitativen Wirkungsbedingungen hierfür geeigneter Pharmaka festlegen zu können.

Als Testobjekt für unsere Untersuchungen wählten wir ein durch Spiralschnitt gewonnenes Streifenpräparat der isolierten Arteria pulmonalis und die (in toto) durchströmte hintere Körperhälfte sensibilisierter Meerschweinchen. Das Durchströmungspräparat erfaßte gegenüber dem Arterienstreifen auch die Arteriolen- und Capillarfunktionen. Gegenüber diesem Vorteil bot es aber auch durch seine Ödembereitschaft nicht über den ganzen Versuch hin völlig konstante Verhältnisse.

Es interessierte bei unseren Untersuchungen die absolute pharmakologische Wirksamkeit der einzelnen Stoffe auf die anaphylaktischen Gefäßtonus-Veränderungen (Kontraktur), und zwar zunächst ohne Berücksichtigung ihrer allgemeinen und lokalen Verträglichkeit.

Getestet wurde neben den typischen Antihistaminica Antistin, Benadryl und Neo-Bridal das Sympathicolyticum Dihydroergotamin und die Wirksamkeit von Calcium-Ionen.

Methodik

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir junge Meerschweinchen, die zum Zeitpunkt der Sensibilisierung ein Gewicht zwischen 200 und 250 g hatten.

Maßnahmen zur Sensibilisierung. Als Antigen benutzten wir natives Eiklar, von dem eine 40%ige homogene Verdünnung mit 0,9%iger Kochsalzlösung hergestellt wurde. Von dieser Eiweißlösung erhielten die Tiere jeden zweiten Tag insgesamt $3 \times 2{,}0$ cm³ i.p. injiziert. Bei einer Gruppe von 7 Tieren betrug die Injektionsmenge nur 1,0 cm³ der Eiweißverdünnung, dafür wurden hier insgesamt 5 Injektionen zum Zwecke der Sensibilisierung vorgenommen. Eine weitere Gruppe erhielt an jedem zweiten Tag insgesamt $3 \times 0{,}2$ cm³ unverdünntes Pferdeserum als Antigen i.p. injiziert. Ein wesentlicher Unterschied im Grad der Sensibilisierung fand sich bei diesen verschiedenen Gruppen nicht. Die Inkubationszeit betrug im Minimum 20 Tage von der letzten Injektion an gerechnet.

Der Erfolg der Sensibilisierung wurde bei der Mehrzahl der Tiere durch die Prüfung der Schultz-Daleschen Reaktion am isolierten Dünndarmsegment kontrolliert, jedenfalls in allen Fällen, wo das Gefäßpräparat nicht selbst allein für den Erfolg der Sensibilisierung sprechen konnte (z. B. bei der Prüfung der Präventivdosis der antianaphylaktisch wirksamen Pharmaka).

Herstellung der Präparate

a) Gefäßstreifen aus der Arteria pulmonalis. Für unsere Methode verwendeten wir die von Lewis u. Koessler an Präparaten aus der Schweine-Carotis und die von E. Grove an einem Gefäßstreifenpräparat aus der A. pulmonalis von Meerschweinchen und Kaninchen gesammelten Erfahrungen.

Nach Eröffnen der Brusthöhle wurde der Herzbeutel von der Spitze aus geschlitzt und bis an den Gefäßabgang abgeschoben. Noch in situ erfolgte das Freipräparieren der A. pulmonalis bis zur Gabelung in die beiden Hauptäste. Danach erst wurde sie in ihrem Abgang noch im Herzmuskel und oberhalb der Gabelung in die beiden Hauptgefäße herausgeschnitten und in ein Tyrode-Bad verbracht. Die zunächst nach dem Vorbild von E. Grove mit einer kleinen Venenschere geschnittenen Streifenpräparate waren von relativ unregelmäßiger Breite. Deshalb gingen wir dazu über, das Arterienröhrchen auf eine eigens hierfür gedrehte Eschenholzsonde von ganz schwach konischer Gestalt und einem mittleren Durchmesser von 3 mm aufzuziehen und mit Hilfe einer Rasierklinge unter Linksrotation der Sonde rechtssteigende Spiraltouren aus dem Arterienrohr zu schneiden. Der so erhaltene Streifen war völlig gleichmäßig, im Durchschnitt 1,5 mm breit und über 20 mm lang. Er wurde an beiden Enden mit einem dünnen Seidenfaden angeschlungen und in ein luftdurchperltes Tyrode-Bad (35,0 ml) von 37,5° C an einem leichten zweiarmigen Schreibhebel aufgehängt, der die Längenänderungen des Präparates auf einem Rußkymographion aufzeichnete. Die Belastung der Präparate betrug je nach Breite und Länge zwischen 200 und 400 mg, sie mußte individuell durch einen auf dem Schreibhebel verschiebbaren Reiter erfolgen, da die Arbeitsweise der Präparate in hohem Maße von der richtigen Ausgangsbelastung abhing. Im allgemeinen belasteten wir nach Lösen der Kältekontraktur (Präparation bei 20° C) im körperwarmen Tyrode-Bad bis zur gerade nicht mehr erfolgenden weiteren Dehnung. Anfänglich zu schwach belastete Präparate lieferten auch nach Korrektur ihres Dehnungszustandes meist keine empfindlichen Reaktionen mehr.

Die zu testenden Stoffe wurden in der entsprechenden Verdünnung in das Badegefäß einpipettiert. Beachtete man nur die gewisse Trägheit des Präparates, nach Auswaschen des kontraktionserregenden Agens oder auf den Zusatz von die Kontraktion lösenden Substanzen wieder auf den Ausgangstonus zu erschlaffen, so erhielt man durchweg gut miteinander vergleichbare Ergebnisse.

b) Hintere Körperhälfte des Meerschweinchens. Bei der Herstellung des Gefäßpräparates aus der hinteren Körperhälfte des Meerschweinchens benutzten wir die Erfahrungen von Kochmann u. Catel. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurden das Rectum, die Blase, bei weiblichen Tieren die Vagina, bei männlichen Tieren die Vasa deferentia und die Samenblase jeweils mit gesonderten Ligaturen versehen, oberhalb der Ligatur die Organe durchtrennt und aus der Bauchhöhle entfernt. Durch einen Querschnitt mit einer kräftigen Schere konnte nun die untere Körperhälfte unterhalb des unteren Nierenpoles abgetrennt werden. Hierauf wurden die Aorta und Vena cava caudalis vorsicht stumpf isoliert, nach Möglichkeit herab bis zur Gabelung in die beiden Iliacagefäße. Zwei Fäden, die später zum Einbinden der Kanüle dienen sollten, wurden jetzt $^1/_2$ cm oberhalb der Teilungsstelle unter der Aorta hindurchgezogen, die Wand der Aorta geschlitzt und das Präparat auf dem mit dem Stativ verstellbar montierten, leicht geneigten Tierbrettchen fixiert. Hierauf wurde eine abgewinkelte Glaskanüle, die mit den die Durchströmungsflüssigkeit enthaltenden Flaschen über einen Gummischlauch luftleer verbunden war, dicht bis zur Teilungsstelle eingeführt. Vier nebeneinander über einen Fünf-Wege-Hahn wahlweise einschaltbare Mariottesche Flaschen waren in ihrer Höhe leicht verschieblich an dem Stativ befestigt. Zu Beginn des Versuches wurde ein Druck von etwa 30—25 cm H_2O aufgewendet, die sich bald sehr prall füllende Hohlvene eventuell von Blutgerinnseln gesäubert. Das Einführen einer Kanüle in die Vena cava erübrigte sich, da auch durch ein auf einer Glasplatte unter das Präparat gelegtes, in seinem überstehenden Zipfel spitz zugeschnittenes Fließpapier ein regelmäßiges Abtropfen der aus der Vena cava austretenden Durchströmungsflüssigkeit gewährleistet war. Der Durchströmungsdruck wurde, nachdem

die Durchströmungsflüssigkeit frei von blutigen Beimengungen war, vorübergehend auf 30—40 cm H_2O erhöht, wodurch die letzten Blutbestandteile mit Sicherheit herausgespült wurden. Hiernach wurde das Präparat auf seine endgültige Durchströmungsgeschwindigkeit von 1 Tropfen/sec eingestellt, was durch einen Druck von 20—25 cm H_2O für gewöhnlich erreicht wurde, notfalls durch Verschieben der Mariotteschen Flaschen am Stativ leicht korrigiert werden konnte.

Als Durchströmungsflüssigkeit verwendete wir eine Ringer-Lösung folgender Zusammensetzung: 1000,0 H_2O, 9,0 NaCl, 0,42 KCl, 0,025 $MgCl_2$, 0,24 $CaCl_2$, 0,5 $NaHCO_3$.

Eine vorherige Sauerstoffsättigung, das Erwärmen über die gewöhnliche Zimmertemperatur auf 37° C oder der Zusatz von Glucose zur Ringer-Lösung erwiesen sich als nicht notwendig. In den verschiedenen Mariotteschen Flaschen fanden sich neben normaler Ringer-Lösung Verdünnungen des Antigens bzw. Verdünnungen der zu testenden antianaphylaktischen Substanzen. Über eine sehr feine, direkt oberhalb der Kanüle in den Gummischlauch eingestochene Injektionskanüle konnten außerdem Antigen- oder Pharmakaverdünnungen in beliebiger Menge ohne Veränderung der Druckverhältnisse im System langsam injiziert werden.

Die Durchströmungsgeschwindigkeit wurde entweder durch fortlaufende Messung der Flußzeit für 10 Tropfen mit der Stoppuhr bestimmt und protokolliert oder aber über einen Tropfenzähler von einem Ordinatenschreiber an einem Rußkymographion fortlaufend registriert[1].

Ergebnisse

a) Kontrollversuche. In einer Reihe von Versuchen an unvorbehandelten Tieren prüften wir zunächst die Eigenwirkung von Hühnereiweiß und Pferdeserum in den später bei den Präparaten sensibilisierter Tiere zur Auslösung der anaphylaktischen Reaktion benötigten Konzentrationen. Hierbei erwiesen sich 1%ige Verdünnungen von frischem Hühnereiweiß und Pferdeserum als noch praktisch unwirksam; dies ergab sich auch für Einzelinjektionen von 1 cm^3 einer 4%igen Lösung des Antigens. Erst bei höheren Konzentrationen kam es in den Durchströmungspräparaten, wohl allein durch die höhere Viscosität der Lösung bedingt, zu einer Durchströmungsverlangsamung.

Am sensibilisierten Durchströmungspräparat trat die anaphylaktische Vasoconstriction in der Regel 1—3 min nach dem Einfließen der antigenhaltigen Lösung ein. Es wurden nach 5—10 min Durchströmungsverlangsamungen auf ein Drittel bis ein Sechstel der ursprünglichen Durchflußmenge, oft auch darüber hinaus, beobachtet. Die anaphylaktische Vasoconstriction löste sich im Verlauf weiterer 20 min partiell. Für die Testung antagonistischer Stoffe waren deshalb nur die ersten 20 min der Reaktion geeignet.

Das Arterienstreifenpräparat reagierte einige Sekunden nach Zusatz des Antigens (Endkonzentration $5 \cdot 10^{-4}$ im Bad) mit einer starken Kontraktion, die bald ihren Höhepunkt erreichte und dann im Verlauf

[1] Für die Überlassung des Ordinatenschreibers und des Tropfenzählers danken wir an dieser Stelle der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

von 10—20 min sich zunächst schneller, dann nur langsam löste (vgl. Abb. 4). Wegen dieser langsamen spontanen Erschlaffung nicht so sehr, als vielmehr wegen seiner relativ trägen Reaktion auf gefäßerweiternde Stoffe war das Präparat mehr zur Testung einer Präventivwirkung antianaphylaktischer Stoffe geeignet.

Die nachfolgend aufgeführten Stoffe wurden nur in Dosierungen geprüft, die nach Kontrollversuchen an unvorbehandelten Tieren noch keine Eigenwirkungen zeigten (z. B. Calcium).

b) Antistin. (Ciba), N-benzyl-N-phenyl-2-imidazolino-methylamin.

Das Antistin vermag an isolierten Meerschweinchen-Därmen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ die anaphylaktische Kontraktur zu lösen (Meier u. Bucher). Die schweren Symptome des anaphylaktischen Schocks des Meerschweinchens verhindern prophylaktische Gaben von 1,0→4,0 mg/kg (Meier u. Bucher, Smith u. Humphrey). Über Erfolge in der Behandlung einiger allergischer Erkrankungen des Menschen mit Antistin berichten Schindler und auch Sarre. Cunz fand einen Antagonismus des Antistin auch gegen den anaphylaktischen Schock des Menschen. Über die gute Beeinflussung der Histaminreaktion an isolierten Gefäßpräparaten berichten neben Meier u. Bucher auch Folkow, Haeger u. Kahlson.

Eine Verhinderung der anaphylaktischen Kontraktur gelang auch nach Vorgabe von $5 \cdot 10^{-5}$ bzw. $1 \cdot 10^{-4}$ Antistin nicht (s. Tab. 1). Der Schock des isolierten Organs wurde hierdurch lediglich etwas gegenüber der Norm abgeschwächt und trat etwas verzögert ein.

Die nachträgliche Beeinflussung der bereits eingetretenen Gefäßreaktion war auch durch Endkonzentrationen von $1 \cdot 10^{-6}$ bzw. $1 \cdot 10^{-5}$ am Arterienstreifenpräparat nur sehr begrenzt möglich (s. Tab. 2). Am Durchströmungspräparat ließ sich noch unter der Dauerdurchströmung mit Antistin in Ringer-Lösung in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ das Schockphänomen auslösen, wenngleich auch hier eine gewisse Verzögerung gegenüber der Norm beobachtet wurde. Der Erfolg bei der Prüfung einer nachträglichen Beeinflussung des Gefäßschocks (Dauerperfusion mit 1%iger Antigenlösung in Ringer) durch Antistininjektionen (1,0—3,0 cm^3 10^{-4}) war so flüchtig und geringgradig (maximale Erweiterung um 5% für 1—2 min), daß wir auf eine Darstellung dieser Ergebnisse verzichten.

c) Benadryl. (Parke, Davis u. Co.), Benzhydryl-β-dimethyl-aminoäthyläther.

Eine Verhütung des tödlichen anaphylaktischen Schockes des Meerschweinchens durch 2—18 mg/kg Benadryl beschreiben u. a. Friedländer, Feinberg u. Feinberg; Loew u. Kaiser; Selle; Mayer, Hutterer u. Scholtz. Die Zweifel von Campbell, Baranofsky u. Good an der Wirksamkeit des Benadryl gegenüber dem anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens werden durch die quantitativen Untersuchungen von Marcus geklärt. Nach Reinhard u. Scudi sollen erst 25 mg/kg Benadryl einen wirksamen Schutz gegenüber dem anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens gewähren. Ein sicherer Antagonismus von Benadryl gegen den Schock des Kaninchens scheint nach Campbell, Baranofsky u. Good nicht zu bestehen. Am Gefäßpräparat des Kaninchens löst dagegen nach Meier

u. Bucher (1949) das Benadryl eine durch die 10fache Konzentration von Histamin ausgelöste Durchflußbehinderung. Ähnliche Beobachtungen machte Reuse auch an den Coronargefäßen von Kaninchen.

Von der Behandlung der Urticaria des Menschen mit Benadryl berichten Pelzer und O'Leary u. Farber Erfolgsziffern von 80—100%.

Die anaphylaktische Kontraktur der Arterienstreifen war auch durch eine Vorgabe von $5 \cdot 10^{-6}$ Benadryl (als Endkonzentration im Bad) nicht zu verhindern (s. Tab. 1). Sie trat nach dem gewohnten Intervall

Tabelle 1

Verhütung der Histaminreaktion bzw. anaphylaktischen Gefäßstreifenreaktion

Wirkung gegen den Schock			Wirkung auf die Histaminreaktion		
Stoff	Konzentration	Schockaufhebung** %	Konzentration	Histaminkonzentration	Aufhebung %
Antistin	$5 \cdot 10^{-8}$	∅	$5 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-6}$	60
	$5 \cdot 10^{-7}$	∅	$1 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-6}$	50
	$1 \cdot 10^{-6}$	∅	$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	100
	$5 \cdot 10^{-5}$	10*	$1 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	100
	$1 \cdot 10^{-4}$	30*	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	100
Benadryl	$1 \cdot 10^{-7}$	∅	$1 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	90
	$1 \cdot 10^{-6}$	∅	$5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	100
	$5 \cdot 10^{-5}$	∅	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	100
			$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	100
Neobridal	$1 \cdot 10^{-8}$	∅	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-6}$	100
	$5 \cdot 10^{-8}$	∅	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-6}$	100
	$5 \cdot 10^{-8}$	∅	$5 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-6}$	100
	$1 \cdot 10^{-7}$	80			
	$1 \cdot 10^{-7}$	90			
	$5 \cdot 10^{-7}$	100			
DHE	$1 \cdot 10^{-7}$	∅	$2 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	∅
	$1 \cdot 10^{-6}$	∅	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$	∅
	$5 \cdot 10^{-6}$	∅	$5 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-7}$	∅
$CaCl_2$	2fach	∅	2fach	$1 \cdot 10^{-6}$	∅
	2fach	∅	2fach	$5 \cdot 10^{-7}$	∅

* Etwas verzögert.

** Gemessen in Prozent der maximalen Kontraktur.

in unverminderter Stärke ein. Bei der Dauerdurchströmung der hinteren Körperhälfte des Meerschweinchens mit 10^{-6} Benadryl in Ringer-Lösung lief die Vasoconstriction ebenfalls wie unter normalen Verhältnissen ab, bei einer Konzentration von 10^{-5} erreichte sie zwar auch ihre volle Höhe, trat aber gegenüber der Norm etwas verzögert ein. Die einmal ausgelöste anaphylaktische Kontraktur der Arterienstreifen war durch eine nachträglich hergestellte Endkonzentration von 10^{-5} Benadryl im Bad nicht mehr zu beeinflussen.

Am mit 1%iger Antigen-Ringer-Lösung durchströmten Gefäßpräparat war unter der anaphylaktischen Vasoconstriction die Wirkung der Injektionen von Benadryl in Konzentrationen bis zu $1 \cdot 10^{-4}$ so schwach und flüchtig (maximale Durchströmungsgeschwindigkeitszunahme unter 5%), daß wir wiederum auf eine Darstellung verzichten.

Tabelle 2. *Nachträgliche Beeinflussung der anaphylaktischen bzw. Histaminreaktion des Arterienstreifens*

Antagonist	Schockgrad	Antagonist. Konzentr.	Lösung der Kontraktur** %	Histaminkonzentr.	Antagonist. Konzentr.	Lösung der Kontraktur in %
Antistin	+++	$5 \cdot 10^{-8}$	∅	$5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$	100
	+++	$1 \cdot 10^{-7}$	∅	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-7}$	80
	++	$1 \cdot 10^{-6}$	20	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$	90
	++	$1 \cdot 10^{-6}$	50	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	100
	+++	$5 \cdot 10^{-6}$	30	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-8}$	70
	+++	$1 \cdot 10^{-5}$	10	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-7}$	50
Benadryl	+++	$1 \cdot 10^{-7}$	∅	$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	100
	++	$1 \cdot 10^{-6}$	∅	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	90
	+++	$1 \cdot 10^{-5}$	10	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	100
Neobridal	+++	$1 \cdot 10^{-7}$	80	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-8}$	100
	+++	$1 \cdot 10^{-7}$	80	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-8}$	100
	+++	$1 \cdot 10^{-7}$	90	$3 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-8}$	70
	++	$1 \cdot 10^{-7}$	100	$2 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-8}$	100
	+++	$1 \cdot 10^{-6}$	50	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-8}$	100
	+++	$1 \cdot 10^{-6}$	80	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-9}$	30
DHE	+++	$1 \cdot 10^{-6}$	∅	$4 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-6}$	∅
	+++	$5 \cdot 10^{-6}$	20	$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	∅
				$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	∅
$CaCl_2$	+	2fach	±	$5 \cdot 10^{-7}$	2fach	∅
	+++	5fach	∅	$5 \cdot 10^{-7}$	5fach	— 20*
	++	5fach	20	$5 \cdot 10^{-7}$	10fach	— 30*
	+++	5fach	∅			
	++	5fach	10			

* Verstärkt die Kontraktur.
** Gemessen in Prozent der maximalen Kontraktur.

d) Neo-Bridal (Bayer, Leverkusen) = N-p-methoxybenzyl-N-(2-pyridyl)-N, N-dimethyl-äthylendiamin.

Getestet am tödlichen Histaminschock des Meerschweinchens fanden Sherrod, Loew u. Schloemer eine höhere Wirksamkeit dieses Präparates als des Benadryls. Der tödliche anaphylaktische Schock des Meerschweinchens läßt sich nach Bovet, Horclois u. Walthert (1944) und Meier u. Bucher (1949) durch vorherige Gaben von 0,1 mg/kg Neoantergan verhindern. Gegenüber der anaphylaktischen Kontraktur des isolierten Meerschweinchen-Darmes ist Neo-Bridal 10mal wirksamer als Antistin oder Benadryl (Meier u. Bucher 1949, Schild 1947). Gegen den anaphylaktischen Herzschaden des Kaninchens ist es nach MacGregor u. Wood

unwirksam, während es nach Dews u. Graham die durch eine 400fache Menge Histamin hervorgerufene Durchflußbehinderung im Gefäßapparat des Kaninchens aufhebt. Reuse prüfte die antagonistischen Eigenschaften von Neo-Bridal auch an den Coronargefäßen des Kaninchens.

Über die Behandlung der menschlichen Urticaria mit Neo-Bridal berichten Hunter und Waldbott 60—90% Erfolge.

Von der relativ hohen antihistaminischen Wirkung des Neo-Bridals im Vergleich zu anderen Antihistaminica konnten wir uns am Gefäßstreifenpräparat überzeugen (s. Tab. 1 u. 2). Bei der Bestimmung der für

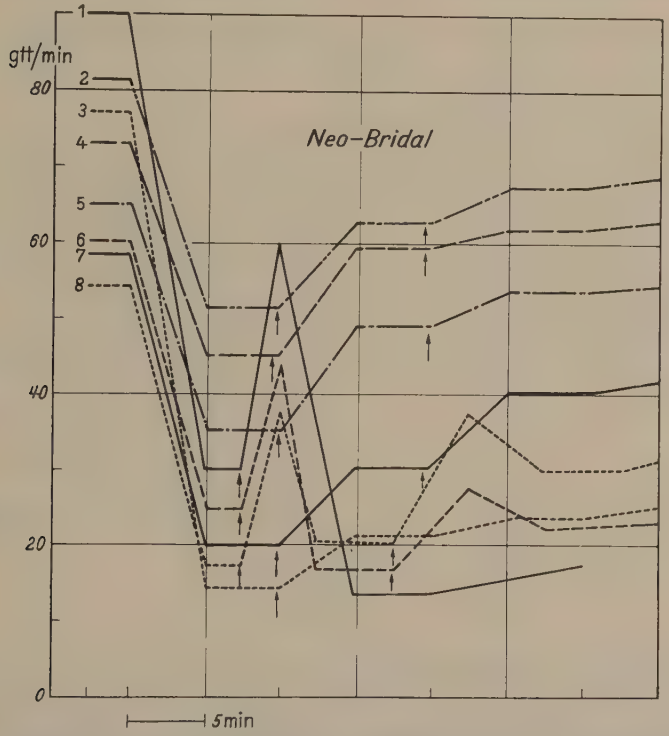


Abb. 1. Wirksamkeit von Neo-Bridal gegenüber der anaphylaktischen Vasoconstriction am Durchströmungspräparat der hinteren Körperhälfte vom Meerschweinchen. — Halbschematische Umzeichnung nach gemessenen Werten für die Durchströmungsgeschwindigkeit (8 Versuche). Ordinate: Tropfenzahl/Minute, Abszisse: Zeit in 5 min-Abschnitten. 1. Niveau: Ausgangsdurchströmungsgeschwindigkeit vor der Durchströmung mit dem Antigen. 2. Niveau: Verengerung der Gefäße unter der anaphylaktischen Reaktion. Bei ↑ Injektion von Neo-Bridal. Bei Versuch 3 ↑ = 0,5 ml 10^{-6}, bei 1, 6, 8 ↑ = 0,5 10^{-5}, bei 2, 4, 5 u. 7 ↑ = 0,5 ml 10^{-4} Neo-Bridal. — Beachte die starke, aber nur flüchtige Wirkung in der frühen Phase der anaphylaktischen Reaktion bei Versuch 1, 6 u. 8

die Schockreaktion prophylaktischen Dosis am isolierten Gefäßstreifen gelang es in der Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ Neo-Bridal den Schock fast völlig zu unterdrücken (vgl. Abb. 5 u. 6), während $5 \cdot 10^{-7}$ den Schock verhinderten. Am durchströmten Gefäßpräparat erwies sich dieser Stoff nicht ganz so wirksam. Allerdings war unter der Dauerperfusion mit

10^{-6} Neo-Bridal in Ringer-Lösung der Schock bis auf eine geringfügige Reaktion, die stark verzögert war, abgeschwächt; eine völlige Verhinderung der anaphylaktischen Vasoconstriction sahen wir jedoch erst bei einer Konzentration von 10^{-5} Neo-Bridal in der Durchströmungsflüssigkeit (s. Tab. 3). Die Ergebnisse der Versuche zur nachträglichen Beeinflussung der Schockreaktion am Durchströmungspräparat haben wir nach den Kurven bzw. Protokollen in der Abb. 1 schematisch umgezeichnet. Dabei finden sich nach Injektionen von 0,5 cm³ 10^{-5} und

Tabelle 3. *Schutzwirkung einer Dauerperfusion mit dem zu testenden Stoff*

Stoff	Konzentration	injizierte Antigenmenge cm³	Konzentration %	Verlauf der Schockreaktion
Antistin	$1 \cdot 10^{-6}$	1,0	5	normal
	$1 \cdot 10^{-6}$	0,5	5	4 min verzögert, normal stark
	$1 \cdot 10^{-6}$	0,5	5	3 min verzögert, normal stark
	$1 \cdot 10^{-5}$	0,5	5	6 min verzögert, normal stark
	$1 \cdot 10^{-5}$	0,5	5	6 min verzögert, normal stark
	$1 \cdot 10^{-5}$	0,5	5	8 min verzögert, normal stark
Benadryl	$1 \cdot 10^{-6}$	0,5	5	normaler Schock
	$1 \cdot 10^{-5}$	0,5	5	4 min verzögert, normal stark
	$1 \cdot 10^{-5}$	0,5	5	10 min verzögert, etwas abgeschwächt
Neobridal	$1 \cdot 10^{-7}$	0,5	5	4 min verzögert, normal stark
	$1 \cdot 10^{-6}$	1,0	5	11 min verzögert u. stark abgeschw.
	$1 \cdot 10^{-5}$	0,5	5	kein Schock mehr auslösbar!
DHE	$1 \cdot 10^{-6}$	0,5	5	normaler Schock
	$1 \cdot 10^{-5}$	0,5	5	n. 16 min verzögert u. abgeschwächt
$CaCl_2$	5fach	0,5	5	kein Schock
	5fach	0,5	5	kein Schock
	5fach	1,0	5	kein Schock

0,1—0,5 cm³ 10^{-4} Neo-Bridal gute bleibende Gefäßerweiterungen, wenn diese Injektionen auf der Höhe der Schockreaktion durchgeführt wurden. Eine nahezu 100%ige Wirkung, d. h. ein Erreichen der Ausgangsdurchströmungsgeschwindigkeit, war wegen des sich unter dem Schock sehr schnell ausbildenden Ödems theoretisch auch niemals zu erwarten. Injektionen zu Beginn der Schockreaktion hatten zwar eine vorübergehend starke Wirkung, verhinderten aber nach ihrer Ausschwemmung nicht einen weiteren Gefäßverschluß auch über das ursprüngliche Maß hinaus.

e) DHE 45 (Sandoz) = Dihydroergotamin als methansulfosaures Salz.

Untersuchungen von Bircher u. Schalch haben gezeigt, daß sowohl das natürliche wie das hydrierte Ergotamin einen antihistaminischen Effekt, getestet am isolierten Meerschweinchen-Darm, besitzen, der aber nur etwa $^4/_{100}$ der Wirksamkeit typischer Antihistaminica darstellt.

Den Histaminschock am Ganztier konnte Hydergin auch bei der Vorgabe von 60% der LD 50 (70 mg/kg) nicht verhindern, während Ergotamin in Dosen von 35 mg/kg eine gewisse Wirksamkeit aufwies. Nach DUBRULLE verhindert Ergotamin die experimentelle Auslösung des anaphylaktischen Bronchospasmus isolierter Lungen sensibilisierter Meerschweinchen, verhindert aber nicht den durch Histamin hervorgerufenen Bronchospasmus.

Nach den Beobachtungen von ROTHLIN, SCHALCH u. BIRCHER ist der anaphylaktische Schock des intakten Meerschweinchens durch Hydergin und Ergotamin in Dosen von 20 bzw. 60% der LD 50 zu verhindern. Am Ganztier ist somit diese antianaphylaktische Wirkung nur 3 mal schwächer als die typischer Antihistaminica.

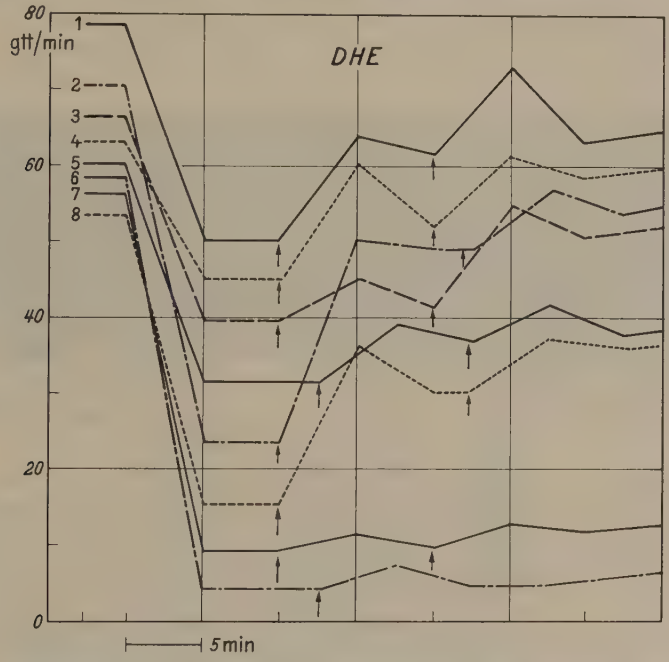


Abb. 2. Wirksamkeit von DHE gegenüber der anaphylaktischen Vasoconstriction am Meerschweinchenhinterschenkel-Durchströmungspräparat (8 Versuchsbeispiele). Darstellung entsprechend Abb. 1. Bei Versuch 2 u. 8 ↑ = Injektion von 0,5 ml 10^{-4}, in allen anderen Fällen Injektion von 1,0 ml 10^{-4} DHE

Aus diesen Untersuchungen kann man schließen, daß der antianaphylaktische Effekt von Hydergin und Ergotamin zum mindesten stärker ist als der antihistaminische Effekt. ROTHLIN (1951) erwähnt eine günstige Beeinflussung der elektrokardiographisch nachweisbaren Veränderungen im anaphylaktischen Schock des Kaninchens durch hydrierte Mutterkornalkaloide. Diese Veränderungen im EKG dürften vorwiegend durch eine durch Coronarspasmen hervorgerufene Anoxämie des Herzmuskels verursacht sein.

Bei der bekannten Gefäßwirksamkeit von DHE bei dem Vorliegen einer gesteigerten Vasoconstriction (ROTHLIN 1946) war deshalb die Prüfung der Wirksamkeit gegenüber der anaphylaktischen Gefäßreaktion berechtigt.

Bei der Bestimmung der die anaphylaktische Kontraktur des isolierten Arterienstreifens verhindernden Dosis von Dihydroergotamin erwies es sich bis zu einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ als völlig unwirksam.

Am Durchströmungspräparat trat die anaphylaktische Vasoconstriction bei einer Dauerperfusion von 10^{-6} DHE prompt und unverändert ein, bei einer Durchströmung mit 10^{-5} DHE war sie dagegen erheblich verzögert und auch gegenüber der Norm abgeschwächt.

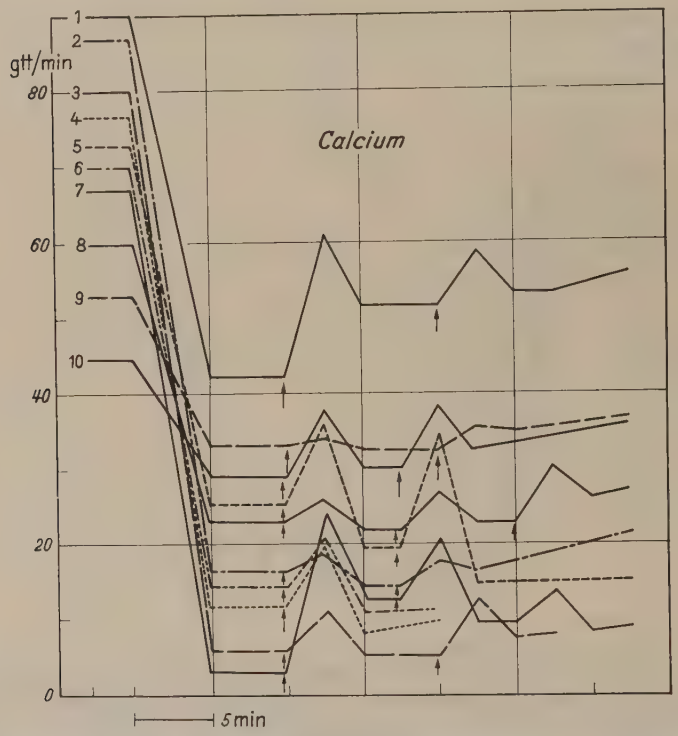


Abb. 3. Wirksamkeit von Calciumionen gegenüber der anaphylaktischen Vasoconstriction am Meerschweinchenhinterschenkel-Durchströmungspräparat (10 Versuchsbeispiele). Darstellung entsprechend Abb 1. Bei Versuch 1, 2, 8 u. 9 ↑ = Injektion von 3,0 ml Ringer-Lösung mit 5fachem Calciumgehalt, in allen anderen Fällen ↑ = Injektion von 3,0 ml Ringer-Lösung 10fachen Calciumgehaltes

Die bereits eingetretene anaphylaktische Kontraktur des Arterienstreifens war auch durch Endkonzentrationen von $5 \cdot 10^{-6}$ DHE im Bad nicht merklich zu beeinflussen.

Am Durchströmungspräparat ergab sich bei der Bestimmung kurativ wirksamer Dosen die gleiche Diskrepanz zwischen der Wirksamkeit an den beiden Präparaten, wie sie bei der Bestimmung einer prophylaktisch wirksamen Dosis schon aufgefallen war. Je nach

Stärke der anaphylaktischen Vasoconstriction und auch nach der Phase der Reaktion waren durch Einzelinjektionen von 0,5—1,0 cm³ $1 \cdot 10^{-4}$ DHE deutliche Erweiterungen, teilweise fast bis zur Ausgangslage zu erzielen (s. Abb. 2). Eine völlige Normalisierung der Durchströmungsgeschwindigkeit war nicht zu erwarten wegen des Ödems, das sich unter der anaphylaktischen Reaktion besonders schnell ausbildete.

f) Calcium-Ionen. Nachdem Schittenhelm, Erhardt u. Warnat 1928 erstmalig darauf hingewiesen hatten, daß es möglich sein müsse, durch die Zufuhr von Calcium-Ionen den anaphylaktischen Symptomenkomplex zu verhüten, und auch Rothlin 1930 das Calcium für diesen Zweck empfohlen hatte, konnten Kallós u. Kallós-Deffner am isolierten Uterus sensibilisierter Meerschweinchen

Abb. 4. Durch Spiralschnitt gewonnenes Gefäßstreifenpräparat der A. pulmonalis eines sensibilisierten Meerschweinchens. Bei ↑ $5 \cdot 10^{-4}$ (alle Angaben verstehen sich als Endkonzentration im Bad) antigenes Hühnereiweiß. Beispiel für den normalen Ablauf einer anaphylaktischen Kontraktur des Gefäßstreifenpräparates

die antianaphylaktische Wirkung direkt nachweisen. Undritz (1937, 1939) berichtet über gute Erfolge der Therapie mit hohen Calciumdosen bei hyperergischen Zuständen des Menschen.

Bei Zwischenfällen in der Serumtherapie, aber auch bei der Urticaria (Kail u. Lindemayr) und anderen Formen allergischer Zustände wird das Calcium heute noch allgemein therapeutisch verwendet.

Neuerdings wird eine Reihe von Antihistaminica in der Kombination mit Calcium empfohlen, da sich bei geringerer Toxicität der Einzelkomponenten die therapeutische Wirkung beider Komponenten potenzieren soll (Cerletti u. Rothlin).

Für die Therapie wurden wegen der geringeren Toxicität gegenüber den anorganischen Salzen des Calciums das Calciumgluconat (Rothlin 1930) oder das Calciumlactogluconat empfohlen. Wir begnügten uns bei unseren Untersuchungen der exakteren Dosierung halber mit Ringer-Lösungen, die einen über die Norm vervielfachten Calciumchloridgehalt besaßen.

Bei der Dauerperfusion schwächte Ringer-Lösung mit einem 5fach über die Norm erhöhten Calciumgehalt den Histamineffekt am Durchströmungspräparat des Meerschweinchen nicht sicher ab. Vergleichsuntersuchungen am durchströmten Kaninchenohr erbrachten das gleiche Ergebnis.

Am Gefäßstreifenpräparat zeigten Ringer-Lösungen mit einem mehr als zweifachen Calciumgehalt bereits eine Eigenwirkung, die in einer leichten Tonuserhöhung bestand. Deshalb wurden hier keine höheren Konzentrationen zur Testung einer prophylaktischen Wirkung des Calciums verwendet. Diese blieben auf die Histaminkontraktur, aber auch auf die durch das Antigen ausgelöste Gefäßstreifenverkürzung ohne

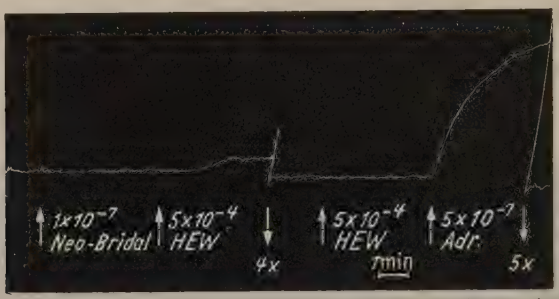


Abb. 5. Präparat wie bei Abb. 4. $1 \cdot 10^{-7}$ Neo-Bridal verhindern die durch $5 \cdot 10^{-4}$ antigenes Hühnereiweiß auszulösende anaphylaktische Kontraktur fast völlig. Nach genügendem Auswaschen auf erneute Gabe von $5 \cdot 10^{-4}$ Hühnereiweiß keine Zweitreaktion mehr bei gutem Ansprechen auf $5 \cdot 10^{-7}$ Adrenalin (positiver Desensibilisierungstest!)

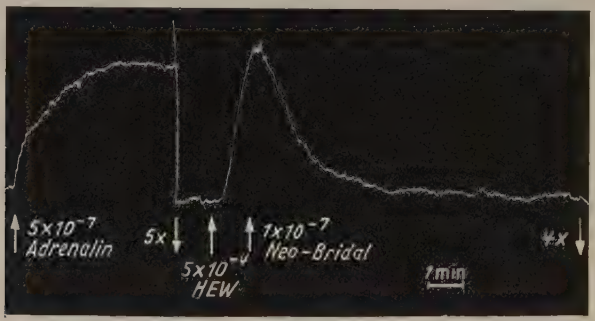


Abb. 6. Präparat wie bei Abb. 4. Gutes Ansprechen auf $5 \cdot 10^{-7}$ Adrenalin. Nach $5 \cdot 10^{-4}$ antigenem Hühnereiweiß rasch einsetzende Kontraktur des Gefäßstreifens. $1 \cdot 10^{-7}$ Neo-Bridal, in die noch an Intensität zunehmende Reaktion hineingegeben, bewirken ein schnelles Lösen der Kontraktur

Einfluß (s. Tab. 1). Am Durchströmungspräparat konnte dagegen die anaphylaktische Vasoconstriction für eine Dauerdurchströmung mit Ringer-Lösung 5fachen Calciumgehaltes vollständig verhindert werden (s. Tab. 3). Die nachträgliche Beeinflussung der anaphylaktischen Kontraktur des Gefäßstreifens war auch bei der 5fachen Calciumchloridkonzentration im Bad nur in beschränktem Umfange möglich (s. Tab. 2). Immerhin sahen wir hier gelegentlich eine geringgradige Lösung der Kontraktur, während die Verkürzung des Gefäßstreifens auf $5 \cdot 10^{-6}$ Histamin hin sogar durch einen 5fachen Calciumchloridgehalt des Bades verstärkt wurde.

Die Vasoconstriction der Durchströmungspräparate nach dem Kontakt mit dem Antigen war durch Injektionen von 1,0—3,0 cm³ Ringer-Lösung 5—10fachen Calciumgehaltes in das System deutlich zu bessern, wenn die erzielten Effekte auch relativ flüchtig waren (s. Abb. 3).

Diskussion

An der Spezifität der nach der Antigen-Applikation beobachteten starken Gefäßreaktionen sensibilisierter Tiere bestand kein Zweifel, da sie mit Antigen-Mengen ausgelöst wurden, die bei unvorbehandelten Tieren in Kontrollversuchen unwirksam waren, und da der Desensibilisierungstest in allen Fällen positiv war. Wir sind uns darüber im klaren, daß am Ganztier die hier diskutierten Gefäßreaktionen durch übergeordnete Mechanismen eventuell noch eine Modifikation erfahren könnten. Das Studium spezifischer anaphylaktischer Reaktionen der Gefäßmuskulatur selbst ist aber überhaupt nur unter vereinfachten und übersichtlichen Versuchsbedingungen möglich. Unsere Ergebnisse sind auf die Verhältnisse des lebenden Gesamtorganismus weitgehend übertragbar, da sie mit den in der Literatur niedergelegten in vivo-Beobachtungen übereinstimmen bzw. diese erklären. Demnach stellt die glatte Muskulatur der Gefäße in ihrer Gesamtheit ein nicht zu vernachlässigendes Organ für den Ablauf anaphylaktischer Reaktionen dar, selbst bei Species, bei denen im letalen Schock andere Organmanifestationen die entscheidende Rolle spielen.

Die schlechte Wirksamkeit von Antistin und Benadryl gegen die anaphylaktische Gefäßreaktion unserer Präparate bei guter antihistaminischer Wirksamkeit sprach u. a. gegen die einseitige Histamintheorie für das Zustandekommen anaphylaktischer Reaktionen. Die nicht einheitliche Wirksamkeit der verschiedenen Antihistaminica (relativ hohe Wirksamkeit von Neo-Bridal) scheint nicht nur eine Frage der Konzentration zu sein, sondern könnte Ausdruck sein für die ungleichmäßig starke Beeinflussung weiterer für die Gefäßreaktion verantwortlich zu machender Wirkungsmechanismen. Bei der Deutung der unterschiedlichen Wirkung von Dihydroergotamin auf die anaphylaktische Reaktion des Gefäßstreifens und des Durchströmungspräparates ist dem unterschiedlichen Strukturcharakter beider Präparate Rechnung zu tragen. In die Reaktion des Durchströmungspräparates gehen ja noch Wirkungen im Arteriolen- bzw. Capillarbereich mit ein.

Für die unterschiedlichen Ergebnisse, die beim Studium der Calciumwirkung an beiden Präparaten erhalten wurden, gilt abgesehen von der reinen Frage der Konzentration wohl auch dieser Einwand.

Ganz allgemein haben darüberhinaus unsere Untersuchungen gezeigt, daß zwischen der Wirksamkeit der verschiedensten antianaphylaktischen Substanzen, getestet mit den bekannten Methoden am isolierten

Uterushorn, am isolierten Dünndarmsegment oder dem Bronchus sensibilisierter Tiere und andererseits der Wirksamkeit auf anaphylaktische Gefäßreaktionen erhebliche Unterschiede bestehen. Daß die mit den ersten Methoden gewonnenen Ergebnisse der tatsächlichen Brauchbarkeit der getesteten Stoffe häufig nicht adäquat sind, ist allgemein bekannt. Es scheint daher bei der großen Rolle, die die Gefäßreaktionen im anaphylaktischen und allergischen Geschehen des Menschen spielen, angebracht, künftighin solche Stoffe, die in der Therapie Anwendung finden sollen, mehr auf ihre Wirksamkeit gegenüber Gefäßreaktionen zu prüfen.

Summary

84 guinea pigs were sufficiently sensitized by repeated injections of egg albumen or horse serum. A spiral strip of the isolated pulmonary artery was cut and its contractions were mechanically registered. Moreover the hind legs were perfused. The specific antigen produced a contraction respectively vasocontraction of all objects belonging to animals, the ileum of which manifested a Schultz-Dale reaction.

The antihistaminic substances Antistin (Ciba; 2-(N-benzylanilinomethyl)-2-imidazoline) and Benadryl (Parke, Davis & Co.; 2-benzhydryloxy-N, N-dimethylethylamine) were prophylactically and therapeutically ineffective against the anaphylactic vascular reaction, in spite of a good antihistaminic action.

On the other hand a certain antianaphylactic action of Neo-Bridal (Bayer, Leverkusen; N, N-dimethyl-N′-(p-methoxy-benzyl)-N′ (2-pyridyl)-ethylenediamine) could be identified in concentrations from $5 \cdot 10^{-7}$ to $1 \cdot 10^{-6}$ besides a high antihistaminic efficacy.

In the concentration of $5 \cdot 10^{-6}$ and higher concentrations DHE 45 (Sandoz; Dihydroergotamine methanesulfonate) showed an antianaphylactic activity in the later phase of the vascular reaction without any antihistaminic effect. It was impossible to prevent the shock by prophylactic doses of DHE.

During perfusion by Ringer's solution with five times higher concentration of calcium the anaphylactic reaction of the perfused hind legs could not be found, where the effect of histamine was not diminished by these concentrations. When the anaphylactic vasoconstriction of the hind legs had taken place any supply of calcium had good effects. On the arterial strip calcium concentrations that are free from side-actions proved ineffective against the specific anaphylactic reaction.

The different efficiency of the investigated substances and the importance of these experimental findings in appreciating the usefulness of drugs which are to be applied in the treatment of allergic and anaphylactic states are discussed.

Literatur

Abell, R. G., and H. P. Schenck: Microscopic observations on the behavior of living blood vessels of the rabbit during the reaction of anaphylaxis. J. of Immun. **34**, 195—213 (1938). — Airila, Y.: Über die Ursache der tödlichen Blutdrucksenkung im akuten anaphylaktischen Schock beim Kaninchen. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpzg.) **31**, 388—393 (1914). — Auer, J., and P. A. Lewis: The physiology of the immediate reaction of anaphylaxis in the guinea-pig. J. of Exper. Med. **12**, 151—175 (1910). — Bartosch, R., W. Feldberg u. E. Nagel: Das Freiwerden eines histaminähnlichen Stoffes bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens. Arch. f. Physiol. **230**, 129—153 (1932). — Die Übertragung der anaphylaktischen Lungenstarre auf die Lunge normaler Meerschweinchen. Arch. f. Physiol. **230**, 674—679 (1932). — Weitere Versuche über das Freiwerden eines histaminähnlichen Stoffes aus der durchströmten Lunge sensibilisierter Meerschweinchen beim Auslösen einer anaphylaktischen Lungenstarre. Arch. f. Physiol. **231**, 616—629 (1933). — Bartosch, R.: Über die Herkunft des Histamins bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens. Klin. Wschr. **1935**, 307—308. — Über das Freisetzen von Histamin durch chemisch bekannte Substanzen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 176 (1936). — Bircher, R., u. W. R. Schalch: Über die Wirkung von Mutterkornalkaloiden bei histaminergischen Reaktionen. Helvet. physiol. Acta, **6**, 813 bis 820 (1948). — Bovet, D., R. Horclois et F. Walthert: Propriétés antihistaminiques de la n-p-méthoxybenzyl-n-diméthyl-amino-éthyl-α-amino-pyridine. C. r. Soc. Biol. (Paris) **138**, 99 (1944). — Burrage, W. S., and I. W. Irwin: Microscopic observations of the pulmonary arterioles, capillaries and venules of living mammals before and during anaphylaxis. J. Allergy **24**, 289—296 (1953). — Campbell, B., J. D. Baranofsky and R. A. Good: Effects of Benadryl on Anaphylaktic and Histamine Shock in Rabbits and Guinea Pigs. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 281—283 (1947). — Cerletti, A., and E. Rothlin: The pharmacological basis of calcium-antihistamine combination. Internat. Arch. Allergy a. appl. Immunol. **6**, 230—242 (1955). — Coca, A. F.: Ther perfusion experiment in the study of anaphylaxis. J. of Immun. **4**, 209—212 (1919). — The mechanism of the anaphylaxis reaction in the rabbit. J. of Immun. **4**, 219—231 (1919). — Cunz, H.: Anaphylaktischer Schock nach Läppchenprobe. Heilung durch Antistin. Schweiz. med. Wschr. **1948**, 159. — Dale, H. H.: The effect of varying tonicity on the anaphylactic and other reactions of plain muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **4**, 517—537 (1912/13). — Croonian lectures on some chemical factors in control of circulation. Lancet **1**, 1179, 1233, 1285 (1929). — Antihistamine substances. Brit. Med. J. **2**, 281—283 (1948). — Dale, H. H., and P. P. Laidlaw: The physiological action of β-iminazolyl-ethylamine. J. of Physiol. **41**, 318—344 (1910/1911). — Further observations on the action of β-iminazolyl-ethylamine. J. of Physiol. **43**, 182—195 (1911). — Histamine shock. J. of Physiol. **52**, 355—390 1918/19). — Danielopolu, D.: Die Idendität der anaphylaktischen Phänomene mit der Acetylcholinwirkung. Paraphylaktischer Schock. Dtsch. med. Wschr. **1943**, 529. — Die acetylcholinische Natur des durch Agar-Agar hervorgerufenen Schockes. Wien. klin. Wschr. **1944**, 132. — Role respectif de l'acétylcholine et de l'histamine dans le choc paraphylactique (anaphylactique). Schweiz. med. Wschr. **1948**, 567—568. — Efficacy of so called anti-histaminic drugs in paraphylactic (anaphylactic) shock does not prove its histaminic origin. Acta med. skand. (Stockh.) **130**, 183—188 (1948). — Dews, P. B., and J. D. P. Graham: Antihistamine substance 2786 R.P. Brit. J. Pharmacol. **1**, 278—286 (1946). — Doerr, R.: Die Immunitätsforschung, VI. Die Anaphylaxie. Wien: Springer 1950. — Drinker, C. K., and J. Bronfenbrenner: The pulmonary circulation in anaphylactic shock. J. of Immun. **9**, 387—406 (1924). — Dubrulle, M.: De l'action inhibitrice du tartrate

d'ergotamine sur le choc anaphylactique. Arch. internat. Pharmacodynamie **69**, 467 (1944). — Folkow, B., K. Haeger and G. Kahlson: Observation on reactive hyperaemia as related to histamine, on drugs antagonizing vasodilatation induced by histamine and on vasodilatator properties of adenosinetriphosphate. Acta physiol. scand. (Stockh.) **15**, 264—278 (1948). — Friedberger, E., u. S. Seidenberg: Versuche mit Serum am isolierten Gefäßpräparaten normaler anaphylaktischer und tuberkulöser Tiere. Z. Immunforsch. **51**, 276—348 (1927). — Friedländer, S., S. M. Feinberg and A. R. Feinberg: Histamine Antagonists. V. Comparison of Benadryl and Pyribenzamine in Histamine and Anaphylactic Shock. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **62**, 65—67 (1946). — Genes, S., u. Z. Dinerstein: Die Gefäßreaktion isolierter Organe bei anaphylaktischen Tieren. Z. exper. Med. **58**, 629—633 (1928). — Grove, E. F.: Studies in Anaphylaxis in the Rabbit II. A study of the Effect of Histamine, Barium Chloride and Epinephrine on Unstriped Muscle of the Guinea Pig and Rabbit. J. of Immun. **23**, 125—138 (1932). — Studies in Anaphylaxis in the Rabbit. IV. On The Simonds Explanation of the Different Pathology of Acute Anaphylactic Shock in Different Animal Species. V. On the Rôle of Unstriped Muscle in Acute Anaphylaxis in the Rabbit. J. of Immun. **23**, 147—152 (1932). — Hansen, K.: Allergie., 3. Aufl. Stuttgart: Thieme 1957. — Humphrey, J. H., and R. Jaques: Liberation of histamine and serotonine from platelets by antigen-antibody reactions in vitro. J. of Physiol. **119**, 43P (1953). — Hunter, R. B.: Neoantergan in treatment of urticaria; report in 14 cases. Lancet **1**, 672—674 (1947). — Kail, F., u. W. Lindemayr: Kritische Gegenüberstellung der Calcium- und Antihistaminwirkung bei der Behandlung der Urticaria. Internat. Arch. Allergy a. appl. Immunol. **3**, 67—75 (1952). — Kallós, P., u. L. Kallós-Deffner: Experimentelle Untersuchungen zur Calciumtherapie allergischer Zustände. Klin. Wschr. **1935**, 1245—1250. — Katz, G., and S. Cohen: Experimental evidence for histamine release in allergy. J. Amer. Med. Assoc. **117**, 1782—1783 (1941). — Kochmann, M., u. W. Catel: Ein leicht herstellbares Gefäßpräparat vom Warmblüter. Z. exper. Med. **32**, 277—280 (1932). — Kritschewski, J. L., u. E. Heronimus: Zur Frage über die zelluläre Natur des anaphylaktischen Schocks und ob die Reaktion sensibilisierter Gefäße auf das Antigen demselben adäquat ist. Z. Immunforsch. **58**, 497—531 (1928). — Lewis, J. H., and K. K. Koessler: Demonstration of Arterial Constriction in Vitro. Arch. Int. Med. **39**, 182—187 (1927). — Loew, E. R., and M. E. Kaiser: Alleviation of anaphylactic shock in guinea pigs with synthetic benzhydryl alkamine ethers. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **58**, 235—237 (1945). — MacGregor, A. G., and D. R. Wood: Effect of neoantergan and of benadryl on seruminduced myocarditis in rabbits. Brit. J. Pharmacol. **4**, 216—218 (1949). — Marcus, St.: Quantitative Aspects of the Inhibition of Anaphylactic Shock in Guinea Pigs. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **66**, 181—184 (1947). — Mayer, R. L., C. P. Hutterer and C. R. Scholz: Antihistaminic and antianaphylactic activity of some α-pyridino-ethylene-diamines. Science (Lancaster, Pa.) **102**, 93—94 (1945). — Meier, R.: Antihistamine agents in allergy antistine and related imidazolines. Ann. New York Acad. Sci. **50**, 1161—1176 (1950). — Meier, R., u. K. Bucher: Pharmakologie des 2-(N-phenyl-N-benzyl-aminoaethyl)-imidazolin (Antistin). Schweiz. med. Wschr. **1946**, 294—296. — Fortschr. Allergielehre **2**, 290. Basel: Karger 1949. — O'Leary, P. A., and E. M. Farber: Evaluation of beta-dimethylamino-ethyl benzhydryl etherhydrochlorid (benadryl) in treatment of urticaria, scleroderma and allied disturbances. Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. **21**, 295—297 (1946). — Pelzer, H.: Klinische Erfahrungen mit dem Antihistamin Dabylen (Diphenyl-dimethylamino-äthyläther). Med. Klin. **1951**, 413—416. — Ratner, B.: Allergy, anaphylaxis and immunotherapie. Baltimore: Williams a. Wilkins 1943. — Reinhard, J. F., and J. V. Scudi: Pharmakologlical

haracteristics of necheteramine, a new antihistaminic drug. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **66**, 512—515 (1947). — Reuse, J.: Comparisions of various histamine-antagonists. Brit. J. Pharmacol. **3**, 174—180 (1948). — Rocha e Silva, M., S. O. Andrade and R. M. Teixeira: Fibrinolysis in peptone and anaphylactic shock in dog. Nature (Lond.) **157**, 801—802 (1946). — Rothlin, E.: Experimentelle Untersuchungen über Resorption und Wirkungsweise des gluconsauren Calciums. Z. exper. Med. **70**, 634—657 (1930). — Experimenteller Beitrag zur Pathologie und Therapie der Spätfolgen des durch Phosgen erzeugten Lungenödems. Schweiz. med. Wschr. **1940**, 641—647. — Zur Pharmakologie des Sympathicolyticums Dihydroergotamin DHE 45. Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1254 bis 1258. — Sympathicolytica im allergischen Geschehen. First Internat. Congr. of Allergy, S. 510—521. Basel: Karger 1951. — Rothlin, E., W. R. Schalch u. R. Bircher: unveröfftl. Versuche; zit. bei: Rothlin, E., and R. Bircher, Allergy, the Autonomic Nervous System and Ergot Alkaloids. Progress in Allergy **3**, 434 (1952). — Rothlin, E., and A. Cerletti: Pharmacologic Studies on a new antihistamine and its combination with calcium. Ann. Allergy **13**, 80—89 (1955). — Sarre, H.: Fortschritte in der Chemotherapie allergischer Erkrankungen. Dtsch. med. Wschr. **1948**, 50—55. — Schild, H. O.: The origin of the histamine-like substance released in anaphylactic shock. J. of Physiol. **86**, 50P (1936). — Histamine release and anaphylactic shock in isolated lungs of guinea pigs. Quart. J. Exper. Physiol. **26**, 165—179 (1936). — Release of histamine-like substance in anaphylactic shock from various organs of the guinea-pig. J. of Physiol. **90**, 34P (1937). — pA, A new scale for the measurement of drug antagonism. Brit. J. Pharmacol. **2**, 189—206 (1947). — Schindler, O.: Klinische Untersuchungen mit der Antihistaminsubstanz Antistin Ciba. Schweiz. med. Wschr. **1946**, 300—305. — Schittenhelm, A., W. Erhardt u. K. Warnat: Untersuchungen über den Mineralstoffwechsel bei der Anaphylaxie. Klin. Wschr. **1927**, 2000. — Über den Kalium- und Calciumgehalt von Blut und Organen des Kaninchen und des Hundes und seine Veränderungen beim sensibilisierten und anaphylaktischen Tier (Anaphylaxiestudien bei Mensch und Tier). Z. exper. Med. **58**, 662—682 (1928). — Schultz, W. H.: Physiological studies in anaphylaxis: I The reaction of smooth muscle of the guinea-pig sensitized with horse serum. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **1**, 549—567 (1909/10). — Selle, W. A.: Histamine—its physiological, pharmacological and clinical significiance. Texas Rep. Biol. a. Med. **4**, 138—244 (1946). — Sherrod, T. R., E. R. Loew and H. F. Schloemer: Pharmacological Properties of the Antihistaminic Drugs Benadryl, Pyribenzamine and Neoantergan. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 247 (1947). — Takasaka, T.: Versuche mit Aalserum am isolierten Gefäßpräparat normaler und vorbehandelter Tiere. Z. Immunforsch. **51**, 482—516 (1927). — Undritz, E.: Zur Therapie anaphylaktischer Zustände mit hohen Calciumdosen. Dtsch. med. Wschr. **1937**, 98—99. — Die Therapie der allergischen Krankheiten; Pharmakotherapie. Fortschr. d. Allergielehre **1**, 352—367 (1939). — Waldbott, G. L.: Clinical results with benadryl. J. Allergy **17**, 142—144 (1946). — Wells, J. A., C. Morris and C. A. Dragstedt: Modification of Anaphylaxis by Benadryl. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **61**, 104—106 (1946). — Significance of Histamine in Trypsin Shock as Determinded by Benadryl. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **62**, 209—213 (1946). — Wenner, W. F., and C. C. Buhrmester: J. Allergy **9**, 85 (1937); zit. n. H. Haas, Histamin und Antihistamine. Aulendorf: Editio Cantor 1951. — Went, S., u. K. Lissák: Histamin- und Proteinwirkung am normalen und sensibilisierten Meerschweinchenherz. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 609—614 (1935).

Dr. G. Engelhardt, Pharmakolog. Institut der Universität Göttingen, Geiststr. 9

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 526—541 (1957)

Aus dem Department of Pharmacology der Harvard Medical School, Boston, Mass.
(Direktor: Prof. Dr. O. Krayer)

Quantitative Untersuchungen zur Frage der Abhängigkeit der Stärke vasoconstrictorischer Wirkungen von der Größe der Ausgangsdurchblutung* **

Von
J. Dörner und C. R. Swaine

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Juli 1957)

Es ist bekannt, daß die Stärke vasoconstrictorischer Wirkungen von dem Kontraktionszustand der Gefäße abhängt. Die allgemeine Annahme ist, daß eine Gefäßkonstriktion auf einen bestimmten Reiz hin um so ausgeprägter ausfällt, je stärker dilatiert das Blutgefäß ist. Soweit wir jedoch sehen, sind die *quantitativen* Beziehungen zwischen dem Kontraktionszustand der Gefäße und der Reaktionsstärke auf constrictorische Reize bisher nicht untersucht worden. Wir versuchten daher an narkotisierten Hunden, die Abhängigkeit der Stärke vasoconstrictorischer Wirkungen von der Größe der Ausgangsdurchblutung zunächst für ein einzelnes Gefäßgebiet aufzuzeigen.

Methodik

Die Versuche wurden an 15 Hunden im mittleren Gewicht von 15 kg (12,9 bis 18,2 kg) durchgeführt. Vorbehandlung der Tiere mit Morphin (2 mg/kg i.m.); $^1/_2$ Std später i.v. Injektion von 1 cm^3/kg einer Chloralose-Urethanlösung (Zusammensetzung pro Kubikzentimeter: 60 mg Chloralose und 250 mg Urethan). Die Hunde atmeten spontan durch Trachealkanüle.

Durchblutungsmessung an den Vv. fem. dextra et sinistra mit Shipley-Rotameter. Die Eichung der Rotameter erfolgte am Ende jedes Versuches mit dem Blut der Tiere. Durch Unterbindung der arteriellen und venösen Hautgefäße und festes Umschnüren der Pfoten wurde die Hautdurchblutung eingeschränkt, so daß im wesentlichen die Muskeldurchblutung zur Registrierung gelangte.

Der Blutdruck wurde in beiden Femoralarterien mit Statham-Elementen (Strain gauges) seitenständig gemessen, indem in eine Schlauchverbindung ein T-Stück eingebunden wurde. Eichung in mm Hg. Alle Vorgänge wurden mit einem Direktschreiber registriert.

---

* Herrn Prof. Dr. F. Hildebrandt zum 70. Geburtstag in Verehrung gewidmet von seinem Schüler J. D.

** Durchgeführt mit Hilfe eines Stipendiums des National Research Council im Rahmen des OEEC-Programms 151. Die Kosten dieser Untersuchungen wurden aus Beiträgen des U. S. Public Health Service (H-2205) und des Eugene Higgins Trust gedeckt.

Berechnung des mittleren Blutdrucks nach $P_{diast.} + {}^1/_3 (P_{syst.} - P_{diast.})$. Errechnung des Gefäßwiderstandes W in den Hinterextremitäten in dyn · sec/cm^5.

Die Bluttemperatur an den Durchströmungsstellen wurde durch Infrarotbeheizung auf normaler Höhe gehalten; die Temperaturmessung erfolgte thermoelektrisch im in die Femoralarterie einströmenden Blute. Die Rectaltemperatur lag immer im normalen Bereich.

Die Gerinnung des Blutes wurde durch i.v. Injektion von 20 mg/kg Mepesulfat („Roche")[1] mit anschließender Dauerinfusion von 20 mg/kg/Std in die V. jugularis externa verhindert.

Die Hinterextremitätengefäße wurden durch Injektionen von Noradrenalin in Dosierungen von 0,75, 1,5, 7,5 und 15 γ/Tier in die A. fem. konstringiert. Diese Mengen wurden in jeweils 0,25 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung gelöst und körperwarm innerhalb 20 sec injiziert. Die Injektionen wurden bei jedem Tier bei den verschiedensten Durchblutungsgrößen vorgenommen. Durch Dauerinfusion von Acetylcholin in die A. fem. konnte die Durchblutung von normalerweise 10 bis 30 cm^3/min bis auf über 300 cm^3/min gesteigert werden.

Die Versuchsdauer betrug vom Zeitpunkt der Narkose an gerechnet im allgemeinen 8—9 Std.

Ergebnisse

Zur Beurteilung des Reaktionsausfalles wurden folgende Größen herangezogen:

1. das Maximum der Durchblutungsabnahme;
2. das Maximum des lokal in der A. fem. gemessenen Blutdruckanstieges;
3. die aus 1. und 2. sich ergebenden Änderungen des Gefäßwiderstandes;
4. die Dauer der Durchblutungsabnahme.

I. Durchblutung

Die Abhängigkeit der maximalen Durchblutungsabnahme von der Größe der Ausgangsdurchblutung bei den vier verschiedenen Noradrenalindosen zeigt die Abb. 1. Mit Ausnahme der kleinsten Dosis von 0,75 γ besteht bei allen Dosierungen bis zu einer bestimmten Durchblutungsgröße, in der Abb. 1 durch eine unterbrochene Linie gekennzeichnet, eine lineare Beziehung zwischen der Größe der Ausgangsdurchblutung und der Stärke der Durchblutungsabnahme. Aus der Lage der Regressionsgeraden und der Größe der Regressionskoeffizienten b[2], die besonders bei den beiden höchsten Dosen nahezu 1 sind, ist zu folgern, daß die Durchblutungsabnahme in dem erwähnten Durchblutungsbereich nach einer gegebenen Dosis Noradrenalin oder einem Kontraktionsreiz bestimmter Stärke immer nahezu maximal ist, unabhängig von der Größe der Ausgangsdurchblutung.

---

[1] Mepesulfat: Na-Salz des Polygalakturonsäuremethylestermethylglykosidsulfates. Für die Überlassung des Präparates danken wir der Fa. Hoffmann-La Roche.

[2] Berechnung der Regressionskoeffizienten b nach S. Koller, „Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen", Dresden und Leipzig 1943, S. 11.

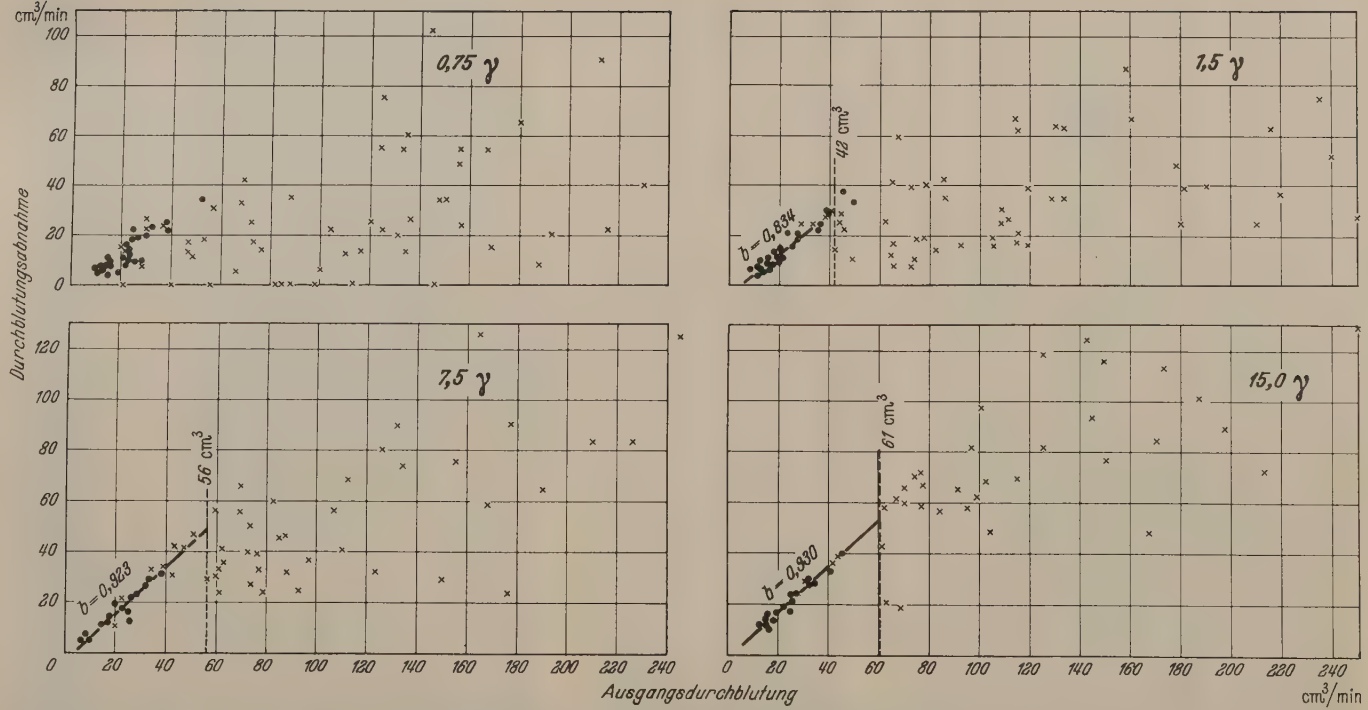


Abb. 1. Beziehungen zwischen der Größe der Ausgangsdurchblutung und der Stärke der Durchblutungsabnahme nach Injektion von 0,75, 1,5, 7,5 und 15 γ/Tier Noradrenalin in die A. femoralis. • bei normaler Ausgangsdurchblutung; × bei Erhöhung der Ausgangsdurchblutung durch Infusion von Acetylcholin in die A. femoralis; *b* Regressionskoeffizienten. Einzelheiten siehe Text

Zum Beispiel beträgt nach einer Noradrenalininjektion von 15 γ/Tier die Durchblutungsabnahme bei einer Ausgangsdurchblutung von 20 cm³/min im Durchschnitt 17 cm³/min und bei einer Ausgangsdurchblutung von 50 cm³/min im Mittel 44,5 cm³/min, so daß eine Restdurchblutung von 3 bzw. 5,5 cm³/min verbleibt. (Der von uns vorstehend gebrauchte Terminus „maximale" Durchblutungsabnahme schließt das Vorhandensein einer solchen für jede Dosis verschieden großen Restdurchblutung ein.) Nach Injektion von 1,5 γ/Tier geht entsprechend dem etwas kleineren Regressionskoeffizienten die Durchblutung mit steigender Ausgangsdurchblutung nicht auf ganz so niedrige Werte zurück (bei 40 cm³/min Ausgangsdurchblutung eine Restdurchblutung von durchschnittlich 11 cm³/min).

Die Regressions*koeffizienten b* der einzelnen Dosen zeigen keine signifikanten Unterschiede[1]. Die Regressions*geraden* erfahren bei den verschiedenen Dosierungen eine annähernde Parallelverschiebung (Abb. 2), d. h. die mittlere Stärke der Durchblutungsabnahme nimmt bei gleich großer Ausgangsdurchblutung mit steigender Dosierung zu. Die Unterschiede in der Lage der Regressionsgeraden sind zwischen den Dosen von 1,5 γ und 15 γ und zwischen 1,5 γ und 7,5 γ hoch signifikant ($P < 0{,}001$), während der Unterschied zwischen den Dosen von 7,5 γ und 15 γ nur mit einer Wahrscheinlichkeit von $P < 0{,}05$ zu sichern ist[2].

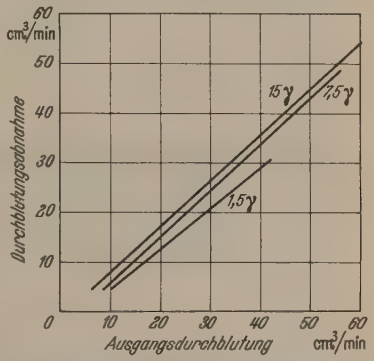


Abb. 2. Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen in der Lage der Regressionsgeraden, die Ausdruck der linearen Abhängigkeit der Stärke der Durchblutungsabnahme von der Größe der Ausgangsdurchblutung für den unteren Durchblutungsbereich sind (Regressionsgeraden nach Abb. 1). Signifikanz der Unterschiede siehe Text

Die vorstehend aufgezeigten Beziehungen zwischen der Größe der Ausgangsdurchblutung und der Stärke der Durchblutungsabnahme ändern sich, sobald ein gewisser Durchblutungsbereich überschritten wird (in Abb. 1 durch die unterbrochenen Linien gekennzeichnet). Bei starker Streuung der Ergebnisse kann nun eine lineare Beziehung, wie sie für den unteren Durchblutungsbereich Gültigkeit hat, nicht mehr aufgezeigt werden. Im Einzelfall ist nicht vorauszusagen, wie stark der Reaktionsausfall sein wird.

Zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse in diesem Durchblutungsbereich sind wir folgendermaßen vorgegangen: Nach Abb. 1 hat es trotz der starken Streuung der Ergebnisse den Anschein, als ob die Durchblutungsabnahme mit steigender Ausgangsdurchblutung im Durchschnitt zunächst zunimmt. Erst oberhalb einer Ausgangsdurchblutung von ungefähr 140 cm³/min scheint es bei allen 4 Dosierungen nicht mehr zu einer weiteren Steigerung der mittleren Durchblutungsabnahme zu kommen. Wir haben daher die mittlere Durchblutungsabnahme für verschiedene Bereiche der Ausgangsdurchblutung (60—99, 100—139 und 140 bis 250 cm³/min)

[1] Statistische Auswertung nach A. Linder, „Statistische Methoden", Basel 1951, S. 101.

[2] Berechnung des Unterschiedes zweier Regressionsgeraden nach A. Linder, „Statistische Methoden", Basel 1951, S. 182/183.

errechnet und die dabei erhaltenen Werte der einzelnen Dosen miteinander verglichen (Abb. 3).

Es bestätigt sich der nach Abb. 1 zu erwartende Befund, daß in höheren Durchblutungsbereichen die Durchblutungsabnahme mit steigender Ausgangsdurchblutung bis zu einer gewissen Größe der letzteren im Mittel zunimmt und daß die Abnahme mit Erhöhung der Dosis im Durchschnitt stärker ist.

Die statistische Auswertung haben wir durch Mittelwertsvergleich unter Benutzung des t-Testes[1] und der einfachen Varianzanalyse[2] vorgenommen. Dabei

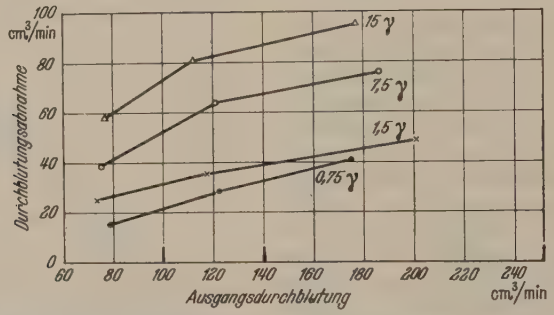


Abb. 3. Mittlere Stärke der Durchblutungsabnahme bei den einzelnen Dosen für die Bereiche der Ausgangsdurchblutung von 60—99, 100—139 und 140 bis 250 cm³/min (Durchschnittswerte nach Abb. 1). Signifikanz der Unterschiede siehe Text

zeigte sich, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen mit Ausnahme der beiden kleinsten Dosierungen fast alle signifikant ($P < 0{,}01$) oder hoch signifikant ($P < 0{,}001$) sind.

Nach den bisherigen Ergebnissen haben wir es in dem untersuchten Gefäßgebiet mit zwei verschiedenen Reaktionsweisen auf vasoconstrictorische Reize zu tun, je nachdem, ob wir uns oberhalb oder unterhalb einer bestimmten, in Abb. 1 durch die unterbrochenen Linien gekennzeichneten Ausgangsdurchblutung befinden. Die Durchblutungsgröße, bei der sich dieser Übergang vollzieht, nennen wir „*kritische Durchblutungsgröße*". Sie kann für jeden einzelnen Versuch annähernd bestimmt werden, wie weiter unten am Beispiel der Abb. 4 gezeigt wird; sie ist jedoch je nach Empfindlichkeit bei den einzelnen Tieren verschieden groß. Man muß sie daher an einem Tierkollektiv ermitteln, wobei wir als kritische Durchblutungsgröße den Wert der Ausgangsdurchblutung bezeichnen, bei dem erstmalig bei einem solchen Kollektiv eine deutliche Abweichung von der linearen Beziehung zwischen Größe der Ausgangsdurchblutung und Stärke der Durchblutungsabnahme auftritt (s. Abb. 1).

[1] A. Linder, „Statistische Methoden", Basel 1951, S. 128.
[2] A. Linder, „Statistische Methoden", Basel 1951, S. 123ff.

Genauer für die Bestimmung der kritischen Durchblutungsgröße wäre es, wenn letztere in jedem einzelnen Versuch ermittelt und das Mittel der so erhaltenen Werte als Maß der kritischen Durchblutungsgröße bei einem Tierkollektiv errechnet würde. Dieses Verfahren ist jedoch wegen der Schwierigkeit einer exakten Festlegung der kritischen Durchblutungsgröße in jedem einzelnen Versuch experimentell nur in zeitraubenden Versuchen durchzuführen.

In Abb. 4 sind die Unterschiede in der Reaktionsweise unterhalb und oberhalb der kritischen Durchblutungsgröße an einer Originalkurve wiedergegeben.

Während in diesem Versuch bis zu einer Ausgangsdurchblutung von 127 cm/min die Durchblutung nach i.a. Injektion von 15 γ/Tier Noradrenalin immer bis auf eine Restdurchblutung von wenigen Kubikzentimetern zurückgeht, ist dies bei der

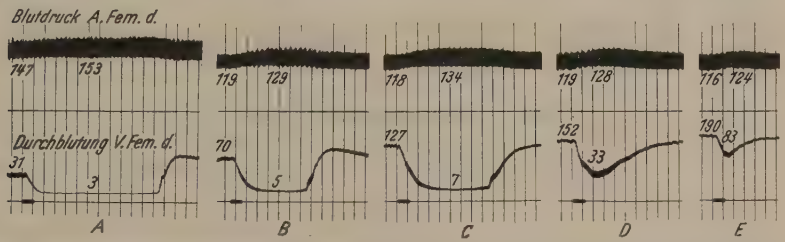


Abb. 4. Die Abhängigkeit der durch 15 γ Noradrenalin verursachten Durchblutungsabnahme von der Größe der Ausgangsdurchblutung an einer Originalkurve wiedergegeben. Die Durchblutung wurde durch i.a. Dauerinfusion steigender Dosen Acetylcholin erhöht. Linienabstand 20 sec. Einzelheiten siehe Text

höheren Ausgangsdurchblutung von 152 bzw. 190 cm³/min nicht mehr der Fall. Die kritische Durchblutungsgröße liegt zwischen 127 und 152 cm³/min. Durch differenziertere Abstufung der Ausgangsdurchblutung läßt sie sich noch exakter festlegen.

Zur Prüfung der Frage, ob die vorstehend aufgezeigten Beziehungen zwischen der Größe der Ausgangsdurchblutung und der Stärke der Durchblutungsabnahme von der Blutkonzentration des injizierten Noradrenalins abhängen, errechneten wir letztere bei allen Versuchen. In Abb. 5 geben wir die dabei erhaltenen Ergebnisse für den Konzentrationsbereich wieder, in den relativ die meisten Werte fielen (0,1—0,19 γ Noradrenalin/cm³ Blut). Trotz des zufälligen Fehlens von Ergebnissen in einem größeren Bereich der Ausgangsdurchblutung ist aus der Abb. 5 deutlich ersichtlich, daß der Reaktionsausfall im Prinzip gleichartig ist wie in Abb. 1. Die mit steigender Ausgangsdurchblutung sich ändernde Noradrenalinkonzentration im Blut dürfte daher für die von der Größe der Ausgangsdurchblutung abhängige Wirkungsweise der Noradrenalininjektionen keine große Bedeutung haben.

Neben der maximalen Durchblutungsabnahme haben wir auch als Maß für die Stärke der Gefäßkonstriktion das Ausmaß der Durchblutungseinschränkung während der Gesamtdauer der Reaktion errechnet. Zu diesem Zweck, und weil die Eichkurven der Rotameter nicht linear verlaufen, haben wir jede Reaktion auf

Millimeterpapier übertragen und die von der Durchblutungsabnahme eingeschlossenen Quadrate ausgezählt. Bei größerer Streuung der Ergebnisse ergaben sich dabei grundsätzlich gleichartige Resultate wie in Abb. 1. Dies zeitraubende Verfahren bietet daher gegenüber der Bewertung der maximalen Durchblutungsabnahme keine Vorteile.

II. Blutdruck

Der Blutdruck wurde in der A. fem. seitenständig gemessen. Die nach i.a. Injektion von Noradrenalin im Durchschnitt aller Versuche erfolgten systolischen und diastolischen Druckänderungen wurden zu der Größe der Ausgangsdurchblutung in Beziehung gesetzt. Sie sind in Abb. 6 wiedergegeben.

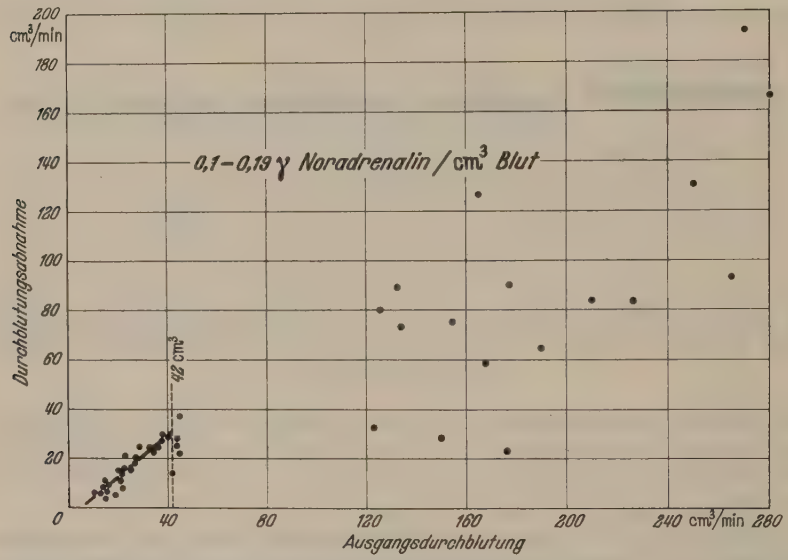


Abb. 5. Beziehungen zwischen Größe der Ausgangsdurchblutung und Stärke der Durchblutungsabnahme bei einer Blutkonzentration des i.a. injizierten Noradrenalins von 0,1—0,19 γ/cm³ Blut

a) Der systolische Blutdruckanstieg ist bei geringer Ausgangsdurchblutung am stärksten. Das Maximum des Anstiegs liegt je nach Dosierung bei einer Durchblutungsgröße von 20—40 bzw. 30—60 cm³/min, d. h. in dem Bereich gerade unterhalb der kritischen Ausgangsdurchblutung nach Abb. 1. Mit Überschreiten der kritischen Durchblutungsgröße fällt der systolische Druckanstieg in Abhängigkeit von der Dosierung mehr oder weniger schnell ab. Bei den kleinsten Dosen erfolgt bei hoher Ausgangsdurchblutung wieder ein leichter Anstieg.

b) Die diastolischen Druckerhöhungen sind bei geringer Ausgangsdurchblutung unbedeutend und betragen unterhalb der kritischen Durchblutungsgröße im Durchschnitt höchstens etwas mehr als 2 mm Hg. Erst bei Überschreiten der kritischen Ausgangsdurchblutung nach Abb. 1 steigen sie auf Werte an, die auch bei weiterer Zunahme der

Durchblutung mit geringfügigen Änderungen beibehalten werden. Dieses Verhalten ist bei den Dosierungen von 7,5 und 15 γ besonders ausgeprägt.

c) Entsprechend den systolischen und diastolischen Druckänderungen ist die Blutdruckamplitude bei einer Ausgangsdurchblutung, die unterhalb der kritischen Durchblutungsgröße liegt, stark vergrößert. Oberhalb der kritischen Ausgangsdurchblutung nähert sie sich in Abhängigkeit von der Dosierung mehr oder weniger schnell den Ausgangswerten, wobei im Höchstfalle eine mittlere Amplitudenvergrößerung von 1 bis 2 mm Hg verbleibt.

Somit ergibt sich, daß die lokalen Blutdrucksteigerungen nach i.a. Injektion von Noradrenalin ebenso wie die Durchblutungsänderungen eindeutige Beziehungen zur Größe der Ausgangsdurchblutung zeigen. Auch hier hat die bei Besprechung der Durchblutungsänderungen beschriebene kritische Durchblutungsgröße als Grenze für den unterschiedlichen Ausfall der Reaktionen zu gelten.

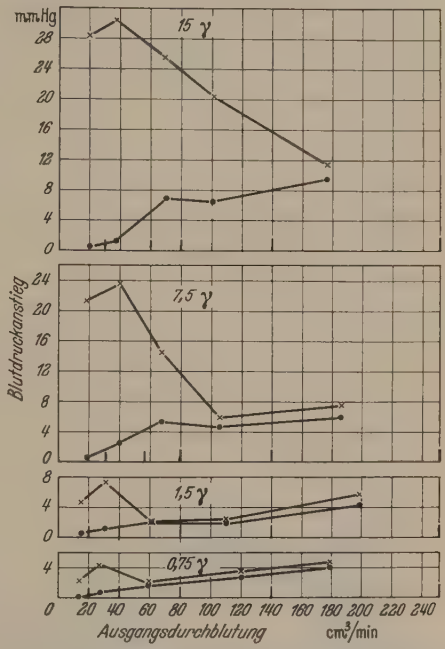


Abb. 6. Abhängigkeit der Stärke der systolischen und diastolischen Blutdruckänderungen nach Injektion von 0,75, 1,5, 7,5 und 15 γ Noradrenalin von der Größe der Ausgangsdurchblutung. Durchschnittswerte für verschiedene Bereiche der Ausgangsdurchblutung (auf der Abscisse gekennzeichnet)

III. Gefäßwiderstand

Die Errechnung des Gefäßwiderstandes und dessen Änderungen in Abhängigkeit von der Größe der Ausgangsdurchblutung in dem der Injektion unterworfenen Strombett ergab die in Abb. 7 wiedergegebenen Resultate. Bei allen Dosierungen sind die Widerstandserhöhungen in dem unteren Durchblutungsbereich sehr ausgeprägt, während sie bei höherer Ausgangsdurchblutung gering werden. Die Änderungen des Widerstandes in dem unteren Durchblutungsbereich sind ferner dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Ausnahme der kleinsten Dosis von 0,75 γ/Tier immer oberhalb eines bestimmten dosisabhängigen Minimalwertes liegen. Erst bei Überschreiten einer gewissen Durchblutungsgröße, die in der Abb. 7 (S. 534) durch die unterbrochenen Linien gekennzeichnet ist, fallen

die Widerstandsänderungen sehr schnell auf geringe Werte ab. Auch hier ist also ein deutlicher Unterschied in der Stärke des Reaktionsausfalls erkennbar, je nachdem ob wir uns unterhalb oder oberhalb einer bestimmten Durchblutungsgröße (kritische Durchblutungsgröße) befinden.

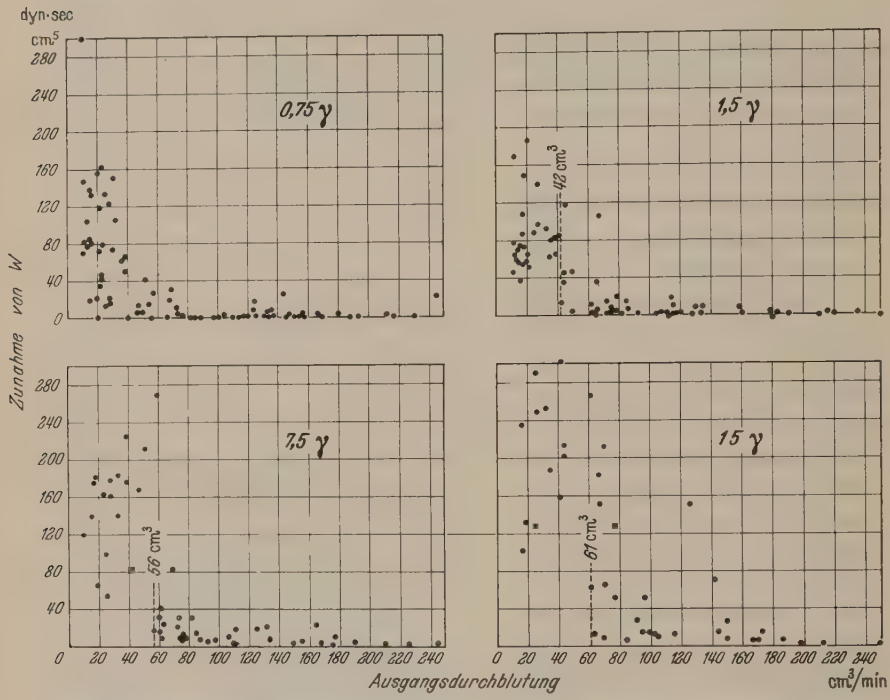


Abb. 7. Änderungen des peripheren Gefäßwiderstandes W in Abhängigkeit von der Größe der Ausgangsdurchblutung nach Injektion von 0,75, 1,5, 7,5 und 15 γ Noradrenalin. Die Ordinatenwerte sind mit 1000 zu multiplizieren. Einzelheiten siehe Text

Ein Vergleich der kritischen Durchblutungsgröße nach Abb. 7 (Widerstandsänderungen) mit der nach Abb. 1 (Durchblutungsabnahme) zeigt weitgehende Übereinstimmung.

Im Unterschied zu den Ergebnissen der Abb. 1 ist bei Bestimmung des Gefäßwiderstandes der Reaktionsausfall *unterhalb* der kritischen Ausgangsdurchblutung sehr wechselnd. Eine Beziehung zur Größe der Ausgangsdurchblutung ist in diesem Durchblutungsbereich nicht zu erkennen. Die Ergebnisse streuen stark, und im Einzelfall kann nicht vorausgesagt werden, wie stark die Änderungen sein werden. *Oberhalb* der kritischen Durchblutungsgröße nähern sich die Ergebnisse einem Minimalwert. Innerhalb beider Durchblutungsbereiche scheint demnach nach Abb. 7 unter Außerachtlassung einer

gewissen mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Tiere zusammenhängenden Übergangszone weitgehende Unabhängigkeit der Stärke der Widerstandsänderungen von der Größe der Ausgangsdurchblutung zu bestehen.

IV. Dauer der Durchblutungsabnahme

Setzt man bei einer bestimmten Dosis Noradrenalin die Dauer der Durchblutungsabnahme zur Größe der Ausgangsdurchblutung in Beziehung, dann resultiert eine erhebliche Streuung der Ergebnisse (Abb. 8

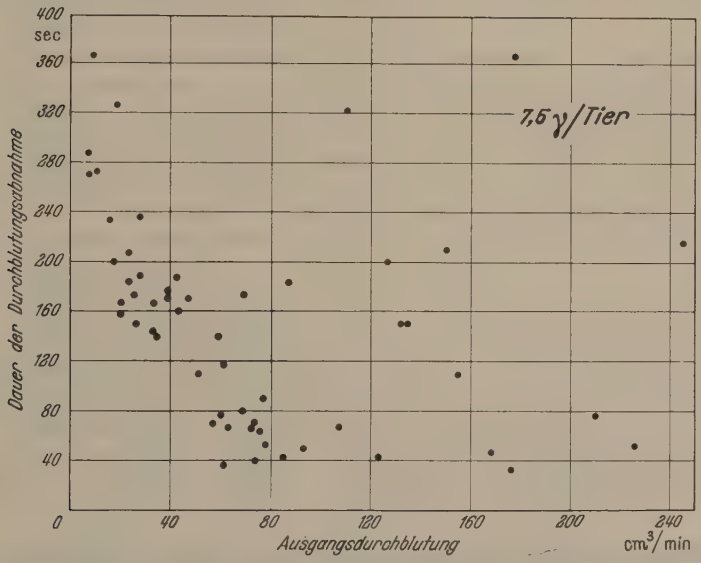


Abb. 8. Abhängigkeit der Dauer der Durchblutungsabnahme von der Größe der Ausgangsdurchblutung bei einer Noradrenalindosis von 7,5 γ. Bei den anderen Dosierungen wurden prinzipiell gleichartige Ergebnisse erhalten

bei einer Noradrenalindosis von 7,5 γ/Tier). Man kann zwar deutlich erkennen, daß in dem unteren Durchblutungsbereich bis etwa 50 cm³/min, d. h. in dem Bereich unterhalb der kritischen Ausgangsdurchblutung, die Durchblutungsabnahme im Mittel länger anhält als bei höherer Ausgangsdurchblutung, daß aber darüber hinaus die Dauer der Abnahme von der Größe der Ausgangsdurchblutung weitgehend unabhängig zu sein scheint. Da bei den übrigen Dosierungen prinzipiell die gleichen Ergebnisse erhalten wurden, wird aus Gründen der Raumersparnis auf deren Wiedergabe verzichtet.

Bei 13% der Reaktionen kehrte die Durchblutung nicht mehr auf den Ausgangswert zurück oder mußte die Dauer als fraglich angesehen werden. Diese Reaktionen blieben daher unberücksichtigt.

Die Auswertung unserer Versuche ergab ferner, daß zwischen der Stärke und der Dauer der Durchblutungsabnahme bei einer bestimmten Dosis Noradrenalin keine deutlichen Beziehungen bestehen.

Setzt man die mittlere Dauer der Durchblutungsabnahme zu der angewandten Dosis in Beziehung, dann resultiert in dem unteren Durchblutungsbereich bis 40 cm³/min eine lineare Abhängigkeit zwischen Noradrenalindosis und Dauer der Durchblutungsabnahme (Abb. 9). Bei höherer Ausgangsdurchblutung dagegen, also oberhalb der kritischen Durchblutungsgröße, konnten wir in unserem Material keine ähnlichen Beziehungen feststellen; die Ergebnisse waren hier sehr wechselnd, daher auch ohne praktische Bedeutung.

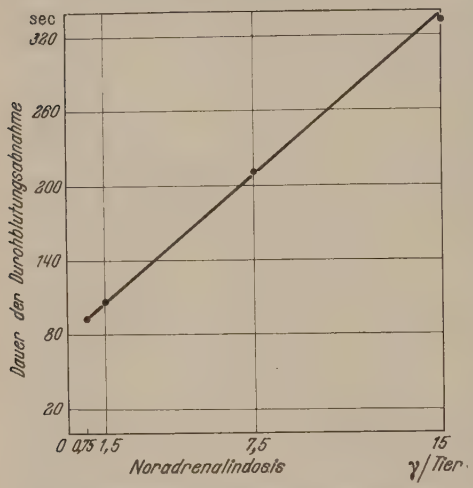


Abb. 9. Abhängigkeit der mittleren Dauer der Durchblutungsabnahme von der Größe der Noradrenalindosis für den Bereich der Ausgangsdurchblutung bis 40 cm³/min

Besprechung der Ergebnisse

Die aufgezeigte starke Abhängigkeit der Stärke vasoconstrictorischer Wirkungen von der Größe der Ausgangsdurchblutung und ihre quantitative Analyse dürften in erster Linie für die Beurteilung vasoconstrictorischer Wirkungen von Bedeutung sein.

1. Durchblutungsänderungen. Aus der Durchblutungskurve kann die Wirkungsstärke eines bestimmten Konstriktionsreizes nur beurteilt werden, wenn *die maximale Durchblutungsabnahme zur Größe der Ausgangsdurchblutung in Beziehung gesetzt wird.* Dabei ist zu unterscheiden, ob die Ausgangsdurchblutung unterhalb oder oberhalb einer bestimmten Größe, von uns „kritische Durchblutungsgröße" bezeichnet, liegt.

a) Unterhalb der kritischen Durchblutungsgröße ist die die lineare Beziehung zwischen der Größe der Ausgangsdurchblutung und der maximalen Durchblutungsabnahme wiedergebende Regressionsgerade zur Beurteilung der Stärke des Reaktionsausfalls heranzuziehen (s. Abb. 1, 2 u. 5). Den Regressionskoeffizienten als Ausdruck der Neigung dieser Regressionsgeraden kommt wegen nur geringfügiger Unterschiede keine große Bedeutung zu. Dagegen besteht eine deutliche, statistisch zu sichernde Abhängigkeit der Lage der Regressionsgeraden von der Stärke des Konstriktionsreizes (annähernde Parallelverschiebung bei den verschiedenen Dosierungen; Abb. 2). Unterschiede in der Stärke

verschiedener Konstriktionsreize können daher statistisch nachgewiesen werden

α) durch unterschiedliche Lage der Regressionsgeraden oder

β) durch unterschiedliche Stärke der Durchblutungsabnahme bei gleich großer Ausgangsdurchblutung.

Letzteres Verfahren dürfte das schwierigere sein. Für die praktische Anwendung könnte daher *die Errechnung und der Vergleich der Regressionsgeraden* empfohlen werden. Der Vorteil gegenüber den weiter unten unter b) und c) diskutierten Verfahren läge darin, daß man im allgemeinen bei normaler Ausgangsdurchblutung arbeiten kann. Nachteilig wirkt sich allerdings aus, daß dieses Vorgehen relativ unempfindlich ist und nur größere Unterschiede in der Stärke des Kontraktionsreizes damit erfaßt werden können.

Ist der Konstriktionsreiz allerdings zu gering (bei uns z. B. 0,75 γ/Tier Noradrenalin; s. Abb. 1), dann muß wegen des Fehlens einer linearen Beziehung der beschriebenen Art die Auswertung in der im folgenden Abschnitt angegebenen Weise erfolgen. Die kritische Durchblutungsgröße wäre in diesen Fällen im unternormalen Durchblutungsbereich zu suchen.

Es darf noch darauf hingewiesen werden, daß bei unserer Versuchsanordnung und der Größe unserer Tiere der Durchblutungsbereich unterhalb der kritischen Durchblutungsgröße fast alle Normalwerte der Ausgangsdurchblutung umfaßt (s. Abb. 1).

b) Oberhalb der kritischen Durchblutungsgröße ist wegen des Fehlens einer linearen Beziehung zwischen der Größe der Ausgangsdurchblutung und der Stärke der Durchblutungsabnahme und wegen der starken Streuung der Ergebnisse als Maß für die Stärke der Gefäßreaktion *die Durchblutungsabnahme für verschiedene Bereiche der Ausgangsdurchblutung* (bei uns z. B. 60—99, 100—139 und 140 cm^3/min und mehr) *im Mittel bei einem Tierkollektiv zu bestimmen* (s. Abb. 3). Wirkungsunterschiede sind durch Mittelwertsvergleich zu verifizieren. Dieses Verfahren scheint uns das empfindlichere zu sein, mit dem es möglich ist, bei entsprechender Anzahl der Versuche auch relativ geringe Wirkungsunterschiede festzustellen.

c) Die kritische Durchblutungsgröße selbst könnte ebenfalls als Maß für die Stärke eines vasoconstrictorischen Reizes Verwendung finden. Voraussetzung wäre allerdings ihre exakte Festlegung in jedem einzelnen Versuch mit abschließender Mittelwertsberechnung. Da dieses Verfahren relativ umständlich und zeitraubend ist, kommt ihm sicher keine praktische Bedeutung zu.

2. Blutdruckänderungen. Will man die nach einem vasoconstrictorischen Reiz bestimmter Stärke in demselben Gefäßgebiet erfolgende Blutdruckänderung zur Beurteilung der Gefäßwirkung heranziehen, so kann dies *an einem Tierkollektiv durch Bestimmung der durchschnittlichen systolischen Drucksteigerungen innerhalb verschiedener Bereiche der Ausgangsdurchblutung* geschehen (Abb. 6). Wirkungsunterschiede sind durch Mittelwertsvergleich zu erfassen. Die starke Streuung der Einzelwerte

auch bei niederer Ausgangsdurchblutung und — im Gegensatz zur Durchblutungsmessung — die in diesem Durchblutungsbereich vorhandene weitgehende Unabhängigkeit der Stärke der Blutdruckänderungen von der Größe der Ausgangsdurchblutung schließen eine Auswertung analog dem unter 1a) angegebenen Verfahren aus.

Die diastolischen Druckänderungen sind, da ohne wesentlichen Unterschied zwischen den einzelnen Dosierungen (Abb. 6), zur Beurteilung der Wirkungsstärke vasoconstrictorischer Reize kaum geeignet.

3. Änderungen des Gefäßwiderstandes. Auch hier sind wegen der starken Abhängigkeit des Reaktionsausfalls von der Größe der Ausgangsdurchblutung und wegen der Streuung der Ergebnisse (Abb. 7) Rückschlüsse auf die Stärke des Konstriktionsreizes nur erlaubt, wenn die Ergebnisse *an einem Tierkollektiv gewonnen werden und der Bewertung die durchschnittliche Zunahme des Gefäßwiderstandes für verschiedene Bereiche der Ausgangsdurchblutung zugrunde gelegt wird.* Zweckmäßigerweise wird man kleinere Bereiche der Ausgangsdurchblutung von z.B. 30—40 cm^3/min zusammenfassen und Wirkungsunterschiede durch Mittelwertsvergleich statistisch sichern. Aus Raumgründen wurde auf eine derartige Wiedergabe der Ergebnisse der Abb. 7 verzichtet.

4. Dauer der Durchblutungsabnahme. Die Frage, ob aus der Dauer der Durchblutungsabnahme Rückschlüsse auf deren Stärke gezogen werden können, ist nicht ohne praktische Bedeutung, da die Dauer der Abnahme in den meisten Fällen exakter zu erfassen sein wird als die Stärke. Zweifellos wird man eine solche Fragestellung nicht verallgemeinern, sondern nur auf Ergebnisse anwenden können, die mit Substanzen von gleich schnellem Wirkungsverlust gewonnen wurden. Da wir immer Noradrenalin verwandten, trifft dies für unsere Versuche zu. Unter dieser Voraussetzung und unter unseren experimentellen Versuchsbedingungen besteht an einem Tierkollektiv in niederen Bereichen der Ausgangsdurchblutung — wir faßten den Bereich bis 40 cm^3/min zusammen — *eine lineare Beziehung zwischen der Größe der Noradrenalindosis und der mittleren Dauer der Durchblutungsabnahme* (Abb. 9). Diese Ergebnisse liefern vielleicht den Ansatz dazu, in bestimmten Fällen auch die Dauer der Durchblutungsabnahme zur Beurteilung der Gefäßwirkung heranzuziehen.

Somit ergibt sich, daß über die starke Abhängigkeit der Stärke der Gefäßreaktion von der Größe der Ausgangsdurchblutung hinaus unabhängig von der Art der gemessenen Größen nur Untersuchungen an einem Tierkollektiv und deren statistische Auswertung zu gültigen Resultaten führen können.

Das infundierte Acetylcholin scheint auf den Ausfall der Reaktionen keinen Einfluß zu haben, da nach Abb. 1 im Bereich unterhalb der kritischen Durchblutungsgröße die Reaktionen ohne und während einer Acetylcholininfusion auf derselben Geraden liegen.

Abschließend sei der Versuch unternommen, die aufgezeigten Beziehungen in einigen Punkten theoretisch zu interpretieren.

Da ist der Befund, daß mit steigender Ausgangsdurchblutung die Durchblutungsabnahme nach einer Standarddosis Noradrenalin nicht vermindert ist, obwohl die Blutkonzentration des injizierten Noradrenalins abgenommen haben muß. Eine der Ursachen dafür ist darin zu sehen, daß nach dem Poiseuille'schen Gesetz die Durchströmungsmenge der vierten Potenz des Radius proportional ist. Änderungen des Durchmessers (in absoluten Einheiten) werden daher bei hoher Ausgangsdurchblutung (großer Gefäßdurchmesser) zu weit stärkerer Abnahme der Durchblutung führen müssen als bei geringer Ausgangsdurchblutung (kleiner Gefäßquerschnitt). Dazu kommt, daß mit zunehmender Dehnung der Gefäßwand die Kontraktionsspannung zunächst zunimmt, ein Optimum erreicht und dann bei Überdehnung nachläßt. Der Einfluß dieser einzelnen Komponenten (Blutkonzentration des injizierten Noradrenalin, Poiseuille'sches Gesetz, Dehnung der Gefäßmuskulatur) auf den Reaktionsausfall dürfte quantitativ nur schwer oder nicht zu erfassen sein. Auf Grund unserer Ergebnisse glauben wir jedoch, folgendes annehmen zu können: Unterhalb der kritischen Durchblutungsgröße ist es vor allem die synergistische Wirkung der mit der vierten Potenz des Radius sich ändernden Durchblutungsgröße und der mit der Dehnung der Gefäßmuskulatur zunehmenden Kontraktionsspannung, die trotz steigender Ausgangsdurchblutung nach einer Standarddosis Noradrenalin die Durchblutung immer auf Minimalwerte einschränkt, so daß bei geringer Streuung der Ergebnisse eine linear erscheinende Beziehung zwischen der Größe der Ausgangsdurchblutung und der Stärke der Durchblutungsabnahme resultiert. Änderungen in der Blutkonzentration des injizierten Noradrenalin scheinen demgegenüber nicht ins Gewicht zu fallen. Oberhalb eines gewissen Bereiches um die kritische Durchblutungsgröße herum ist die Gefäßmuskulatur überdehnt, so daß ihre Kontraktionsspannung abnimmt. Mit zunehmender Gefäßerweiterung verhält sich diese damit immer stärker antagonistisch zu der Wirkung der Querschnittsänderung auf die Durchblutung. In gleicher Richtung wirkt sich die abnehmende Blutkonzentration des injizierten Noradrenalins aus. Dieses gegensinnige, im einzelnen quantitativ nicht genau festlegbare Verhalten dürfte die Erklärung dafür geben, daß in diesem Durchblutungsbereich bei erheblicher Streuung der Ergebnisse die Durchblutungsabnahme mit zunehmender Ausgangsdurchblutung im Mittel zunächst noch etwas zunimmt, um dann nicht mehr stärker zu werden. Der Bereich der kritischen Durchblutungsgröße in jedem einzelnen Versuch könnte danach Ausdruck einer relativ, d. h. im Verhältnis zur Stärke des Konstriktionsreizes optimal entwickelten Kontraktionsspannung der Gefäßmuskulatur sein.

Bei den in der A. fem. proximal des konstringierten Gefäßgebietes gemessenen Blutdruckänderungen ist zu berücksichtigen, daß eine mäßige systolische und diastolische Drucksteigerung allein dadurch zustande kommen kann, daß nach Konstriktion der Hinterextremitätengefäße der periphere Gesamtwiderstand zunimmt, falls nicht andere Gefäßgebiete kompensatorisch erweitert werden sollten. Dieser Effekt ist um so größer, je höher die Ausgangsdurchblutung, d. h. je stärker die vorausgehende Gefäßerweiterung ist. Auf der anderen Seite dürften aber Einflüsse des injizierten Noradrenalins auf den elastischen Widerstand eine wesentliche Rolle spielen. Erhöhung des letzteren führt zu Zunahme des systolischen und Abnahme des diastolischen Druckes, vorausgesetzt, daß die Durchströmung gleich bleibt. Aus unseren Versuchen ergibt sich, daß im Bereich unterhalb der kritischen Durchblutungsgröße der systolische Druck sehr stark ansteigt, während der diastolische Druck fast unverändert bleibt oder nur sehr gering erhöht wird. Wir nehmen an, daß es hier zu einer stärkeren Wirkung auf den elastischen Widerstand kommt, wobei die Senkung des diastolischen Druckes durch die starke Abnahme der Durchströmungsmenge aufgehoben wird. Mit zunehmender Gefäßerweiterung treten die Wirkungen auf den elastischen Gefäßwiderstand zurück oder machen sich weniger stark bemerkbar, so daß nun die Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes für die in ihrem Ausmaß sich nähernden systolischen und diastolischen Drucksteigerungen verantwortlich zu machen ist.

Die Änderungen des Strömungswiderstandes in dem der Konstriktion unterworfenen Gefäßgebiet der A. fem. streuen in niederen Bereichen der Ausgangsdurchblutung stark (Abb. 7), während die Werte für die entsprechenden Durchblutungsänderungen eng beieinander liegen (Abb. 1). Die Ursache mag darin gesehen werden, daß geringe Durchblutungswerte von einigen cm^3/min auf der Originalkurve in Millimetern oder Bruchteilen davon abgelesen werden müssen. Im Verhältnis zur Größe der Durchblutung ist die Messung dabei mit einem relativ großen Fehler belastet. Da die Bestimmung des Strömungswiderstandes auf der Errechnung des Verhältnisses von Druck zu Durchblutung beruht, machen sich bei kleiner Durchblutungsgröße (z. B. während der Vasoconstriction) geringe Meßfehler derselben als starke Abweichungen des Gefäßwiderstandes bemerkbar.

Inwieweit die für ein einzelnes Gefäßgebiet erhobenen Befunde auch für andere Gefäßgebiete in gleicher Weise Gültigkeit haben, bedarf weiterer Klärung.

Summary

Experiments were carried out on the vascular bed of the femoral artery in 15 dogs. Blood flow was measured with a Shipley rotameter; blood pressure was measured in the femoral artery with a strain gauge

manometer. Vascular constriction was produced by the intraarterial injection of Levarterenol in four different doses. The initial blood flow was varied by an intraarterial infusion of acetylcholine.

Decrease in blood flow, increase in systolic and diastolic blood pressure, change in vascular resistance and the duration of the blood flow decrease were evaluated.

The results show a dependence of the magnitude of the blood flow decrease and the other measured or calculated parameters upon the magnitude of the initial blood flow. While the decrease in blood flow was a linear function of the initial blood flow in the lower flow ranges, no such relationship was apparent with higher blood flows. The blood flow value at which the linear relationship is no longer obvious is called the critical blood flow.

The relationship between initial blood flow and maximal increase in femoral blood pressure and the relationship between initial blood flow and maximal increase in vascular resistance are compared to the blood flow relationships.

It is concluded that changes in vasoconstrictor effects may be compared only when the results are obtained in a sufficiently large number of animals and when the magnitude of the vascular reaction is related to the initial blood flow. Furthermore, the results are discussed from a theoretical point of view.

Doz. Dr. med. J. Dörner, Pharmakologisches Institut der Universität Gießen, zur Zeit Bad Nauheim, W.-Kerckhoff-Institut
Dr. C. R. Swaine, Dept. of Pharmacol., Harvard Med. School, Boston 15, Mass.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 542—549 (1957)

Aus der Pathophysiologischen Abteilung des „Korányi"-Landesinstituts für Tuberkulose, Budapest

Die Wirkung von Histamin und 48/80* auf den Gasstoffwechsel und die Körpertemperatur weißer Ratten

Von

ENDRE KOMLÓS und ISTVÁN FÖLDES

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Juli 1957)

Es sind derzeit viele Verbindungen bekannt, welche im Organismus Histamin freisetzen. Von diesen „Histamin-Liberator" Verbindungen hat 48/80 ein besonderes Interesse, da fast alle seine pharmakologischen Wirkungen dem im Organismus freigesetzten Histamin zugeschrieben werden. Diese Eigenschaft von 48/80 gibt eine Möglichkeit für die vergleichende Untersuchung der Wirkungen des im Organismus freigesetzten und des von außen eingeführten Histamins.

Die Wirkung des Histamins auf die Körpertemperatur und den Gasstoffwechsel wurde von vielen Autoren untersucht (H. H. DALE u. P. P. LAIDLAW 1911—1912, M. JANCSÓ 1947, B. ISSEKUTZ jr., I. LICHTNECKERT u. H. NAGY 1953, L. GYERMEK 1950, F. HERR u. J. PORSZÁSZ 1951, H. EPPINGER, D. LÁSZLÓ u. A. SCHÜRMEYER 1928, J. ABELIN 1922, M. FABINYI u. J. SZEBEHELYI 1948). Diese Wirkungen, welche auch von der Größe der angewendeten Dosen und der Umgebungstemperatur abhängig sind, sind nach Ansicht der meisten Autoren sekundär, d. h. die Folge der Kreislaufänderungen und Adrenalinmobilisierung. Es schien uns interessant, die Verbindung 48/80 und das von außen eingeführte Histamin in Hinsicht dieser komplizierten und sekundären Wirkungen zu vergleichen.

---

* Die Verbindung 48/80 ist ein Gemisch der bei der Kondensation von p-Methoxyphenyläthylamin und Formaldehyd entstehenden dimeren, trimeren und tetramen Verbindungen. Für die Überlassung der notwendigen Versuchsmengen sprechen wir auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. W. FELDBERG (National Institut For Medical Research, London) und Dr. A. C. WHITE M.D. (The Wellcome Research Laboratories, Beckenham) unseren verbindlichsten Dank aus.

Methodik

Zu unseren Versuchen verwendeten wir 150—200 g schwere, in unserem Institut gezüchtete weiße Ratten beiderlei Geschlechts, die mit 0.8 g/kg Urethan s.c. leicht narkotisiert waren. Der Gasstoffwechsel wurde in 10 min-Perioden mit Hilfe des von Issekutz-Issekutz jr. (1942) konstruierten Stoffwechselapparates gemessen. Die Temperatur des Wasserbades betrug 20—30° C. Nachdem wir in 6—8 Perioden den Grundumsatz der Tiere bestimmt hatten, hoben wir den Apparat aus dem Wasserbad heraus und injizierten Histamin bzw. 48/80 i.p., worauf wir den Apparat wieder in das Wasserbad stellten. Das nahm bei einem Tier höchstens 2 min in Anspruch. Der Wert der ersten 10 min-Periode wurde verworfen. Der O_2-Verbrauch in Milliliter wurde auf 100 cm^2 Körperoberfläche bezogen. In den Tabelle ist der O_2-Verbrauch in Stunden, in den Abbildungen in 10 min-Perioden dargestellt.

Die Körpertemperatur wurde bei einer Außentemperatur von 20—30° C an separiert im Käfig gehaltenen Ratten rectal mit Hilfe eines Quecksilberthermometer gemessen.

Die mit 48/80 behandelten Tiere benutzten wir erst nach Ablauf von 40 bis 45 Tagen erneut zum Versuch.

Die statistische Bearbeitung der Ergebnisse erfolgte mit dem Studentschen „t"-Verfahren.

Ergebnisse

Aus der Tab. 1 ist ersichtlich, daß Histamin (80 mg/kg i.p.) den Sauerstoffverbrauch bei 30° C bedeutend erhöht; er steigt — auf 100 cm^2 Körperoberfläche berechnet — in der 1. Std nach der Histaminverabreichung im Durchschnitt von 73 cm^3 auf 104,2 cm^3, d. h. um etwa 42%. Den zeitlichen Verlauf der Stoffwechselsteigerung zeigt die Abb. 1. Sie ist schon 20 min nach der Injektion wahrnehmbar und erreicht ihr Maximum nach 40 min. Zu diesem Zeitpunkt ist der O_2-Verbrauch um 58% größer als der Grundwert und ist nach 90 min noch immer um 15% erhöht.

Bei einer Außentemperatur von 20° C ist die Wirkung umgekehrt. Der bei der niedrigen Außentemperatur höhere Grundstoffwechsel fiel von 130,7 auf 107,6 cm^3/100 cm^2/Std ab, d. h. um 17%. Die Verminderung ist 20 min nach der Histamingabe am größten, der O_2-Verbrauch beträgt zu diesem Zeitpunkt nur $^2/_3$ des Ausgangwerts, und in der 90. min ist er noch immer 11% niedriger als der Grundumsatz.

Im weiteren untersuchten wir, wie ein der Gefäßreaktion des Histamins entgegenwirkendes Antihistamin die Stoffwechselwirkung von Histamin beeinflußt. Nach Bestimmung des Grundstoffwechsels verabreichten wir unseren Tieren 10 mg/kg Synopen i.p. und nach 10 min gaben wir das Histamin. Vorher stellten wir fest, daß Synopen in den verwendeten Dosen keine Wirkung auf den O_2-Verbrauch hat. Tab. 1 und Abb. 1 zeigen die Resultate dieser Versuche. Bei einer Außentemperatur von 30° C beeinflußt Synopen die Wirkung des Histamins praktisch nicht und auch der zeitliche Verlauf der Stoffwechselsteigerung bleibt unverändert.

Tabelle 1. *Wirkung von Histamin*

Zahl der Versuchstiere	Verabreichte Mittel mg/g i.p.	O_2-Verbrauch (ml/100 cm³/Std) bei 30° C			Statistische Auswertung
		vor	nach		
		Injektion			
		1 Std	1 Std	2 Std	
10—10	Histamin 80 mg/kg	75,4 ± 8,1	104,2 ± 17,4	—	$p < 0{,}001$
10—10	Histamin 5 mg/kg	64,7 ± 7,1	75,6 ± 12,2	—	$0{,}2 > p > 0{,}1$
10—10	Histamin 80 mg/kg	78,7 ± 5,4	102,3 ± 10.9	—	$p < 0{,}001$
10—10	48/80 0,5 mg/kg	76,7 ± 8,9	80,0 ± 17,9	—	$0{,}5 > p > 0{,}4$
10—10	48/80 1,0 mg/kg	70,1 ± 10,4	67,5 ± 7,6	71,3 ± 10,6	—
10—10	48/80 0,5 mg/kg	78,1 ± 7,4	69,9 ± 13,4	—	$0{,}1 > p > 0{,}05$
10	48/80 1,0 mg/kg	—	—	—	—

Bei einer Temperatur von 20° C verhindert Synopen praktisch die den O_2-Verbrauch vermindernde Wirkung des Histamins; aus der Zeitkurve ist ersichtlich, daß die maximale Senkung in der 20. min nach der Injektion nur 8% beträgt.

Es ist bekannt, daß Adrenalektomie die Histaminempfindlichkeit der Ratten bedeutend steigert. Wir untersuchten deshalb die Wirkung von 5 mg/kg Histamin auf den O_2-Verbrauch adrenalektomisierter Ratten. Wir fanden — wie Tab. 1 und Abb. 1 zeigen —, daß die Erhöhung des Stoffwechsels bei 30° C 17% war, was statistisch nicht signifikant ist, und daß die maximale Erhöhung in der Zeitkurve nur 15% betrug, also bedeutend weniger als bei normalen Tieren. Zur selben Zeit ist die Verminderung des Stoffwechsels bei 20° C auf die Wirkung dieser kleinen Dosis ebenso groß wie die einer 16mal größeren Dosis bei normalen Tieren.

Daraufhin untersuchten wir die Wirkung von 0,5 mg/kg bzw. 1,0 mg/kg 48/80 i.p. unter denselben Umständen. Wie aus der Tab. 1 ersichtlich ist, beeinflußte 0,5 mg/kg 48/80 den O_2-Verbrauch der Ratten weder bei 30° C noch bei 20° C. Nach Verabreichung von 1,0 mg/kg 48/80 (Tab. 1, Abb. 1) konnten wir bei einer Temperatur von 30° C keine Erhöhung, ja sogar in den ersten 20 min eine unbedeutende Verminderung des O_2-Verbrauchs beobachten. Bei niedrigerer Temperatur (20° C) nahm der O_2-Verbrauch deutlich ab. Diese Abnahme beträgt in der 1. Std 44%, in

und 48/80 auf den O_2-Verbrauch von Ratten

O_2-Verbrauch (ml/100 cm^2/Std) bei 20° C			Statistische Auswertung	Bemerkung
vor	nach Injektion			
1 Std	1 Std	2 Std		
130,7 ± 13,5	107,6 ± 8,0	—	0,01 > p > 0,01	
110,4 ± 10,0	91,1 ± 12,8	—	p < 0,001	Nebennierenlose Tiere
119,4 ± 13,8	115,5 ± 12,1	—	0,2 > p > 0,1	Antihistaminschutz
114,2 ± 9,2	109,9 ± 24,3	—	0,7 > p > 0,6	
125,6 ± 13,9	70,8 ± 12,5	72,1 ± 17,7	p < 0,001	
122,0 ± 11,0	92,9 ± 28,3	—	0,01 > p > 0,001	Nebennierenlose Tiere
130,5 ± 14,4	106,7 ± 24,4	117,9 ± 20,3	0,01 > p > 0,001	Antihistaminschutz

der 2. noch immer 43%. Aus der Zeitkurve ist ersichtlich, daß die Wirkung von 48/80 viel länger andauert, als jene des Histamins; während der O_2-Verbrauch 90—100 min nach Histamin den Ausgangswerten nahekommt, bleibt er nach Verabfolgung von 48/80 180—200 min lang bedeutend unter den Grundwerten. Die maximale Verminderung beträgt auf unsere Zeitkurve etwa 50%.

Da 48/80 in einer Dosis von 1,0 mg/kg beinahe lethal ist, haben wir die Wirkung größerer Dosen nicht untersucht. Wir untersuchten aber, ob Synopen in einer Dosis von 10 mg/kg, welche bei 20° C die Wirkung von 80 mg/kg Histamin auf den O_2Verbrauch praktisch verhindert, die ähnliche Wirkung von 48/80 auch antagonisieren kann. Wie aus Tab. 1 ersichtlich, ist die den O_2-Verbrauch vermindernde Wirkung von 48/80 nach Vorbehandlung mit Synopen bedeutend geringer, jedoch immer noch deutlich; sie ist nicht viel kleiner als die Wirkung von 80 mg/kg Histamin ohne Vorbehandlung mit Synopen. Auch die Zeitkurve ist verlängert. Bei den adrenalektomisierten Ratten untersuchten wir wegen der größeren Histaminempfindlichkeit die Wirkung von 48/80 auf den Gasstoffwechsel in Dosen von 0,5 mg/kg. Diese Dosis hat bei 30° C keine signifikante Wirkung, bei 20° C vermindert sie aber den O_2-Verbrauch bedeutend. Die Tiere vertrugen diese Dosis gut (Tab. 1).

Die Wirkung auf die Körpertemperatur untersuchten wir bei 20° C und 30° C Außentemperatur bei nicht narkotisierten sowie bei narkotisierten

Ratten in Gruppen von je 10 Tieren (Abb. 2). 1,0 mg/kg 48/80 verursachte bei 30° C nur eine unbedeutende Verminderung der Körpertemperatur sowohl bei den wachen als auch bei den narkotisierten Tieren; sie betrug höchstens 1° C. Bei 20° C Temperatur sank die Körpertemperatur der nicht narkotisierten Tiere 2,5 Std nach der Injektion von 38,7° C auf 33,2° C, die der narkotisierten Tiere von 35,4° C auf 28,9° C.

Bei den vorliegenden und noch nicht veröffentlichten Versuchen ist noch eine Beobachtung von Interesse; bei leicht narkotisierten Tieren

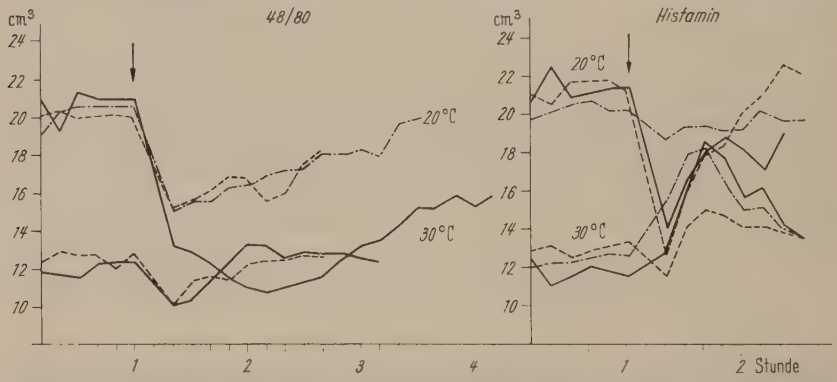


Abb. 1. Die Wirkung von 48/80 und Histamin auf Sauerstoffverbrauch bei 20 und 30° C. Durchschnittsergebnisse von je 10 Rattenversuchen. O_2-Verbrauch während 10 min berechnet auf 100 cm² Körperoberfläche. —— Die Wirkung von 1,0 mg/kg 48/80 bzw. 80,0 mg/kg Histamin i.p. ---- Die Wirkung von 0,5 mg/kg 48/80 bzw. 5,0 mg/kg Histamin i.p. bei nebennierenlosen Ratten. -·-·-·-· Die Wirkung von 1,0 mg 48/80 bzw. 80,0 mg/kg Histamin unter Antihistaminschutz

ist 48/80 weniger toxisch als bei nicht narkotisierten Tieren; so starben z. B. von den 20 zu den Körpertemperaturversuchen verwendeten, nicht narkotisierten Tieren 7, von den narkotisierten nur 2.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Ergebnisse, betreffend die Wirkung von Histamin auf den Gasstoffwechsel, stehen in Einklang mit jenen von Herr u. Porszász (1951) und Issekutz jr., Lichtneckert u. Nagy (1953), die ähnlich wie wir fanden, daß Histamin den O_2-Verbrauch der Ratten bei 30° C erhöht und bei 20° C vermindert. Hingegen können wir die Ergebnisse von Gyermek (1950) nicht bestätigen; er fand, daß Histamin bei 20° C den O_2-Verbrauch nicht beeinflußt. Auch die Beobachtung von Gyermek (1950), daß Histamin den Gasstoffwechsel adrenalektomierter Ratten bei 30° C nicht erhöht, sondern vermindert, können wir nicht ganz bestätigen. In unseren Versuchen verursachte Histamin bei solchen Tieren — wenngleich in geringerem Maße als bei den Kontrolltieren — eine

Erhöhung des O_2-Verbrauchs. Ein ähnliches Resultat bekam Gyermek (1951) später bei einer anderen Versuchsreihe, in welcher er adrenalektomierten Ratten unter Antihistaminschutz 80 mg/kg Histamin verabreichte. Gyermek (1950) experimentierte mit seinen Ratten 5 Tage nach der Adrenalektomie, wir erst später, nach 3—4 Wochen. Houssay (1955) hingegen berichtete, daß die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Histamin monate-, ja sogar jahrelang nach der Entwicklung der akzessorischen Nebennieren bestehen bleibt. Das beweisen auch unsere Versuche, da 5 mg/kg Histamin — also eine Dosis, die nur $^1/_{16}$ der bei Kontrolltieren gebrauchten war — bei 20° C eine bedeutende Verminderung des Stoffwechsels verursachte. Das kann also den Unterschied zwischen unseren Ergebnissen und denen von Gyermek (1950) nicht erklären.

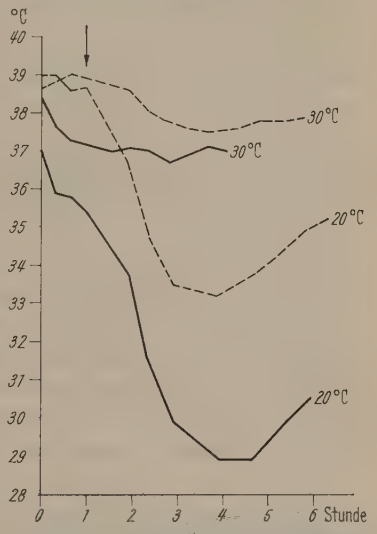


Abb. 2. Die Wirkung von 48/80 auf Körpertemperatur bei 20 und 30° C. Durchschnittsergebnisse von je 10 Rattenversuchen. —— Die Wirkung von 1,0 mg/kg i.p. verabreichten 48/80 bei mit 0,8 g/kg Urethan s.c. narkotisierten Ratten. - - - - Dieselbe bei nicht narkotisierten Ratten

Nach unseren Versuchen unterscheidet sich die Wirkung von 48/80 auf den Gasstoffwechsel von jener des von außen eingeführten Histamins in vielfacher Beziehung. Zum ersten dauert die Wirkung von 48/80 bei 20° C bedeutend länger. Da die Freisetzung des endogenen Histamins einen lang andauernden Blutdruckfall und Gefäßerweiterung verursacht, ist es leicht zu verstehen, daß auch die Verminderung des Stoffwechsels länger andauert als bei Verabreichung von Histamin. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß 48/80 im Gegensatz zu Histamin den O_2-Verbrauch bei 30° C nicht erhöht, sondern eher vermindert.

Man erklärt die Wirkung des Histamins auf den Stoffwechsel bei verschiedener Außentemperatur folgendermaßen: bei 20° C, in der relativ kalten Umgebung, entsteht infolge der großen Gefäßerweiterung eine bedeutende Wärmeabgabe, infolgedessen kühlt das Tier ab und nimmt der Stoffwechsel ab. Man kann die ähnliche Wirkung von 48/80 gleicherweise erklären. Bei 30° C ist die Wärmeabgabe geringer; da die Hautgefäße bei solcher Temperatur schon erweitert sind, ist die zusätzliche Erweiterung, welche als Wirkung des Histamins eintritt, gering, weshalb seine adrenalinmobilisierende Wirkung rasch zur Geltung gelangt. Demzufolge steigt der O_2-Verbrauch. Wir können nicht erklären, warum 48/80 den O_2-Verbrauch bei 30° C im Gegensatz zu Histamin nicht erhöht. Die rasche Mobilisierung des Adrenalins soll mit der „Stresswirkung" des Histamins in Zusammenhang stehen. Man mag daran denken, daß 48/80 bzw. das freiwerdende Histamin keinen „Stressreiz"

repräsentiert. Nasmyth (1955) aber berichtete, daß der Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren nach 48/80 stark vermindert ist, was auf „Stresswirkung" von 48/80 hindeutet. Es ist jedenfalls direkt nachgewiesen, daß von außen eingeführtes Histamin in den Nebennieren Adrenalin freisetzt (J. H. Burn u. H. H. Dale 1926 und W. Feldberg u. H. Schilf 1930); über 48/80 fanden wir in der Literatur keine solchen Angaben. Es ist also möglich, daß die Ursache des Unterschiedes zwischen den Wirkungen von Histamin und 48/80 auf den Stoffwechsel darin besteht, daß 48/80 oder das von ihm freigesetzte endogene Histamin keine oder nur geringe Adrenalin freisetzende Wirkung hat.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß in der Wirkung von 48/80 auf den Stoffwechsel nicht nur das von ihm freigesetzte Histamin eine Rolle spielt. Schon Paton beschrieb (1951), daß im Organismus von 48/80 nicht nur Histamin, sondern auch ein anderer, den Meerschweinchendarm langsam kontrahierender Stoff freigesetzt wird. In der letzten Zeit nehmen die Angaben zu, laut denen 48/80 neben Histamin auch Serotonin freisetzt (B. K. Bhattacharya u. G. P. Lewis 1956). Die Wirkung dieser Stoffe auf den Stoffwechsel ist noch unbekannt.

Schließlich ist es auch möglich, daß 48/80 *selbst* auf den O_2-Verbrauch einwirkt, so daß für die Wirkung von 48/80 auf den Stoffwechsel nicht nur das freiwerdende Histamin verantwortlich ist. Dafür sprechen auch unsere — mit quantitativen Unterschieden nicht erklärbaren — Ergebnisse, daß 10 mg/kg Synopen die stoffwechselvermindernde Wirkung von 80 mg/kg Histamin bei 20° C vollkommen verhindert, jene von 48/80 aber nur teilweise hemmt.

Unter anderen experimentellen Verhältnissen und bei Untersuchung einer anderen Wirkung von Histamin kamen J. Alberti u. R. Takunnen (1956) zum gleichen Erfolg; bei ihren Antagonisierungsversuchen gelangten sie zur Schlußfolgerung, daß die Histaminfreisetzung für die von ihnen untersuchte Wirkung von 48/80 nur teilweise verantwortlich war.

Bei der Wirkung auf den Stoffwechsel ist auffallend, wie klein die Wirkungsbreite der Verbindung 48/80 im Gegensatz zu Histamin ist; 0,5 mg/kg 48/80 i.p. beeinflußt den Gasstoffwechsel noch nicht, 1,0 mg/kg hat schon eine starke Wirkung; doch steht diese Dosis der lethalen nahe.

L. C. Wyman, L. L. Drapeau u. G. P. Fulton (1956) beschreiben, daß Dial-Urethan-Narkose bei Hamstern — welche den Ratten ähnliche Histaminempfindlichkeit besitzen —, die Toxicität von Histamin bedeutend steigert. Die Verbindung 48/80 verhält sich auch unter diesem Gesichtspunkt anders, da wir fanden, daß die nicht narkotisierten Tiere die Behandlung mit 48/80 bedeutend schlechter ertrugen, als die mit Urethan narkotisierten Ratten.

Nach den Ergebnissen von B. Issekutz jr., I. Lichtneckert, H. Nagy (1953) und Gyermek (1950) erhöht Histamin die Rectaltemperatur bei Ratten bei 30° C Temperatur und vermindert sie bei 20° C. Issekutz jr. u. Mitarb. (1953) teilten auch mit, daß die Urethannarkose die temperatur-herabsetzende Wirkung von Histamin nicht steigert, sondern nur verlängert. Die Wirkung von 48/80 unterscheidet sich auch in dieser Beziehung von der des Histamins; genau wie bei der Stoffwechselwirkung bei 30° C war keine Erhöhung der rectalen Temperatur zu

beobachten, im Gegenteil fanden wir eine geringe Senkung. Bei 20° C konnten wir eine starke temperatursenkende Wirkung beobachten, welche bei den narkotisierten Tieren — obgleich deren Temperatur schon vor der Verabreichung von 48/80 viel niedriger war als jene der nicht narkotisierten Ratten — bedeutend größer war als bei den wachen Tieren.

Zusammenfassung

1. Wir untersuchten die Wirkung des Histamins und der Verbindung 48/80 auf den O_2-Verbrauch und die rectale Temperatur weißer Ratten bei 20° C und 30° C Außentemperatur.

2. Die Wirkung der 2 Stoffe ist nicht vollständig gleich. Histamin vermindert den O_2-Verbrauch bei 20° C und erhöht ihn bei 30° C, dagegen beeinflußt 48/80 den Gasstoffwechsel bei 30° C nicht und vermindert ihn bei 20° C.

3. Bei 20° C antagonisiert das Antihistaminicum Synopen die den O_2-Verbrauch vermindernde Wirkung des Histamins völlig, während die Verbindung 48/80 diese nur verringert.

4. Bei 30° C erhöht Histamin die rectale Temperatur von Ratten und vermindert sie bei 20° C. 48/80 vermindert die rectale Temperatur der Ratten unbedeutend bei 30° C und stark bei 20° C.

5. Die Wirkung von 48/80 auf den Gasstoffwechsel und die Körpertemperatur dauert viel länger an als jene von Histamin.

6. Unsere Meinung ist, daß das durch 48/80 freigesetzte Histamin für die Wirkung von 48/80 nur teilweise verantwortlich ist.

Literatur

Abelin, J.: Biochem. Z. **129**, 1 (1922). — Alberty, J., et R. Takunnen: Arch. internat. Pharmacodynamie **108**, 366 (1956). — Bhattacharya, B. K., and G. P. Lewis: Brit. J. Pharmacol. **11**, 202, 411 (1956). — Burn, J. H., and H. H. Dale: J. of Physiol. **61**, 185 (1926). — Dale, H. H., and P. P. Laidlaw: J. of Physiol. **43**, 182 (1911/12). — Eppinger, H., D. László u. A. Schürmeyer: Klin. Wschr. **1928**, 2231. — Fabinyi, M., u. J. Szebehelyi: Arch. internat. Pharmacodynamie **75**, 402 (1948). — Feldberg, W., u. H. Schilf: Histamin. Berlin: Springer 1930. — Feldberg, W., u. J. Talesnik: J. of Physiol. **120**, 550 (1953). — Gyermek, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 456 (1950). — Gyermek, L., u. Gy. Pataky: Acta physiol. (Budapest) **2**, 179 (1951). — Herr, F., u. J. Porsász: Acta physiol. (Budapest) **2**, 17 (1951). — Houssay, R. H.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **149**, 1664 (1955). — Issekutz, B., u. B. Issekutz jun.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 308 (1942). — Issekutz, B. jun., I. Lichtneckert u. H. Nagy: Arch. internat. Pharmacodynamie **81**, 35 (1953). — Jancsó, M.: Orv. Lapja **1947**, 1025. — Nasmyth, P. A.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 51 (1955). — Paton, W. D. N.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 499 (1951). — Wyman, L. C., L. L. Drapeau and G. P. Fulton: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **92**, 467 (1956).

Dr. E. Komlós, Budapest XII (Ungarn), Pihenö-ut 1,
Pathophysiolog. Abteilung des Korányi-Landesinstituts für Tuberkulose

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 550—561 (1957)

Physiologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften und Pharmakologisches Institut der hygienischen Fakultät der Karls-Univ., Prag

Die Wirkung des Chlorpromazins und der Glykämie auf das elektrophysiologisch kontrollierte Überleben der Hirnrinde bei verschiedenen Körpertemperaturen

Von

O. Benešová, O. Burešová und J. Bureš

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Mai 1957)

Im Zusammenhang mit dem zunehmenden Interesse für die therapeutische Anwendung der sogenannten „Hibernation" haben sich in der letzten Zeit Kliniker und Experimentalforscher der Frage zugewendet, ob an der günstigen Wirkung dieser Methode außer der niedrigen Körpertemperatur auch noch jene pharmakologischen Mittel beteiligt sind, die zur Einführung der Hypothermie verwendet werden. Nach der ursprünglichen Vorstellung von Laborit (1954) ruft der wichtigste Bestandteil seiner sogenannten lytischen Mischung — das Largactil (Megaphen, Chlorpromazin) — eine Erniedrigung des Zellstoffwechsels hervor. Außerdem soll Chlorpromazin eine ausgesprochen ganglioplegische Wirkung haben, welche die Reaktion des Organismus auf starke Außenreize — unter anderem auch auf das Abkühlen — charakteristisch dämpft.

In Versuchen mit isoliertem Hirngewebe wurde wirklich von mehreren Autoren nach Zugabe von Chlorpromazin zum Medium eine Erniedrigung des O_2-Verbrauches (Gänshirt, Brilmayer 1954, Courvoisier u. Mitarb. 1953, Berti, Balestrieri 1953, Kok 1956) sowie der oxydativen Phosphorylationen (Berger u. Mitarb. 1956, Bernsohn u. Mitarb. 1956) beschrieben. Demgegenüber haben Century u. Horwitt (1956) an Hirnschnitten aus Ratten, welche 1 Std vor der Tötung 10 mg/kg Chlorpromazin bekommen hatten, einen signifikant erhöhten O_2-Verbrauch festgestellt. Finkelstein u. Spencer (1954) wiederum konnten am Katzengehirn in vitro bei Chlorpromazinkonzentrationen, welche den in vivo vorkommenden entsprechen, keine Erniedrigung des Sauerstoffverbrauchs feststellen. Auch Grenell u. Mitarb. (1955), welche mit Rattenhirnen arbeiteten und dieselben 30 min nach Gaben von 10—50 mg/kg i.p. Chlorpromazin homogenisierten, haben keine Veränderungen in der Respiration festgestellt, wohl aber eine Erhöhung des ATP-Gehaltes, vor allem im Gebiete des Mesencephalons.

Nicht einmal die Messung des O_2-Verbrauches in vivo brachte klarere Ergebnisse. Während Bernsmeier u. Gottstein (1956) ihren früheren Befund (Bernsmeier 1954) bestätigen konnten, daß Chlorpromazin (2—7 mg/kg i.v.) den O_2-Verbrauch des menschlichen Gehirns erniedrigt (Ermittlungen auf Grund der

arteriovenösen Differenz und von Durchflußmessungen nach KETTY u. SCHMIDT 1948), haben FROWEIN u. Mitarb. (1955) nach ähnlichen Dosen keine Veränderungen im O_2-Verbrauch des Hundegehirns gefunden. Bei der Messung der Überlebenszeit des Hirngewebes unter den Bedingungen der akuten Ischämie oder Anoxie ergaben nach SCHOSTOCK (1954) Dosen von 10—20 mg/kg Chlorpromazin keine Erhöhung der Toleranz von Hunden gegen Asphyxie, und es ist darüber hinaus sogar festgestellt worden, daß Chlorpromazin (WIEMERS u. KANIAK 1954) die Überlebenszeit des Cornealreflexes bei Kaninchen und das Überleben von Mäusen (ANKERMANN 1956) in einem geschlossenen Gefäße verkürzt. Auch die auf elektrophysiologischem Wege bestimmten Überlebenszeiten der Hirnrinde werden nach FROWEIN u. Mitarb. (1955) bei Katzen durch Chlorpromazin nicht verlängert. Es ist daher ganz verständlich, daß SCHNEIDER in seinem Sammelreferat (1956) den Mechanismus der Hibernisationseingriffe im wesentlichen auf die Veränderungen der Körpertemperatur zurückführt und eine direkte Wirkung dieser Pharmaka auf den Hirnmetabolismus als strittig bezeichnet.

Wir selbst haben zur Feststellung der Wirkung des Chlorpromazins eine bisher wenig bekannte elektrophysiologische Erscheinung, nämlich die sogenannte anoxische Terminaldepolarisation (LEÃO 1947, VAN HARREVELD, STAMM 1953, BUREŠ 1957, BUREŠ, BUREŠOVÁ 1957) herangezogen. Die Oberfläche der Hirnrinde ist normalerweise positiv gegen andere indifferente Punkte (Ischiadikus, Hirnventrikel, zerstörtes Hirngewebe usw.). Bei einer Unterbrechung der Hirnzirkulation beginnt diese Positivität erst nach 1—3 min (also zu einer Zeit, in welcher das EEG längst verschwunden ist) anfangs schnell, und später etwas langsamer abzusinken. Es wurde vorgeschlagen, diese anoxische Terminaldepolarisation, welche vielleicht ein Ausdruck des Versagens des anaeroben „Strukturumsatzes" ist (GÄNSHIRT u. Mitarb. 1954), als Indicator für das Überleben der Hirnrinde zu benützen. Die ersten Versuche, die praktische Brauchbarkeit dieses Vorschlages zu prüfen, wurden in unserer letzten Arbeit durchgeführt (BUREŠ, BUREŠOVÁ 1957).

Methodik

Die Versuche wurden mit weißen Ratten (Stamm Wistar, Gewicht 120—200 g) durchgeführt. Den Tieren wurden unter lokaler Interkainanaesthesie in den Schädelknochen 3 Öffnungen (*A*, *B*, *C*) trepaniert. Das Hirngewebe wurde entweder in der vorderen Trepanationsöffnung (Abb. 1, Schema links) oder in der Trepanationsöffnung der linken Hemisphäre (Abb. 1, Schema rechts) durch Thermokoagulation zerstört, und diese Stelle diente dann als Referenzpunkt. Die Gleichspannungspotentiale wurden durch Kalomelelektroden abgeleitet. Die Registrierung der Gleichspannungsunterschiede zwischen dem Vergleichspunkt *C* und den symmetrischen Stellen *A* und *B* auf den beiden Hemisphären erfolgte auf dem Schirm eines Kathodenoszillographen und zwar nach der durch einen speziellen Umschalter bewirkten Zerlegung der Gleichspannungspotentiale in 0,2—0,3 sec dauernde Impulse und nach Verstärkung dieser Impulse mittels eines Wechselspannungsverstärkers. Die langsame Entwicklung der Potentiale ermöglicht es, die oszillographischen Kurven in geeigneten Zeitabständen (je 30 sec) direkt auf einen Pauspapierstreifen abzuzeichnen.

Der eigentliche Versuch wurde wie folgt durchgeführt: Einige Minuten hindurch wurden die Ausgangspotentiale *CA* respektiv *CB* gemessen. Dann wurde die Ratte

durch Dekapitation getötet und die Depolarisation der Hirnrinde 5—10 min lang verfolgt. Als Maß der Depolarisationsgeschwindigkeit wurde jene Zeit gewählt, in welcher die Hirnrindenpolarität nach der Dekapitation auf die Hälfte des Ausgangswertes absank (die „Halbzeit" der Terminaldepolarisation). Die Versuche wurden ohne Narkose durchgeführt, und zwar entweder bei normaler Körpertemperatur (Messung mittels rectalen Thermoelementes) oder nachdem die Ratten durch Eintauchen in Eiswasser auf 20° C abgekühlt worden waren. Die Applikation von Chlorpromazin (10—20 mg/kg i.v.) beziehungsweise von Dial (25 mg/kg i.v.) erfolgte 2—3 Std vor dem Versuche.

Die Hyperglykämie wurde mit einer Glucosedosis von 2 g/kg des Körpergewichtes i.v. (40% Glucose) 30—45 min vor der Dekapitation erreicht. Die Hypoglykämie wurde durch eine Insulindosis von 0,1 IE/kg i.v. 20—30 min vor der Dekapitation hervorgerufen. Der Blutzucker wurde nach Nelson (1944) photometrisch bestimmt.

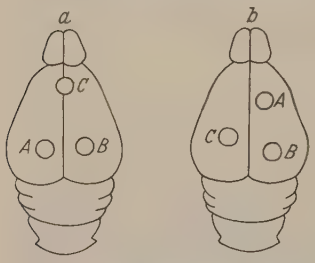


Abb. 1. Schematische Darstellung der Trepanationsöffnung über den Hirnhemisphären. Unter *A* und *B* normale Hirnoberfläche, unter *C* das durch Thermokoagulation zerstörte Rindengebiet

In den Versuchen mit lokaler Applikation der Glucose wurde 15 min vor der Dekapitation auf das Gebiet *A* (s. Abb. 1, Schema rechts) ein kleines mit 20% Glucoselösung getränktes Filtrierpapier (2×2 mm) angelegt, während das Kontrollgebiet *B* analog mit physiologischer Lösung behandelt wurde. Vor der Dekapitation wurden beide Filtrierpapierchen weggenommen, und die überflüssige Lösung wurde abgesaugt. Auf diese Weise wurde der Vergleich der Schnelligkeit der Terminaldepolarisation in den Gebieten *A* und *B* ermöglicht.

In einer besonderen Versuchsreihe wurden die Veränderungen des pO_2 der Hirnrinde mittels der polarographischen Methode von Davies u. Mitarb. (1942, 1947) verfolgt. Die in einem Glasröhrchen eingeschmolzene, am 4 mm weit frei vorragenden Ende hakenförmig abgebogene Platinelektrode (Kathode) wurde durch eine parietale Trepanationsöffnung (von 3 mm ⌀) tangential in die Hirnrinde eingeführt und an den Schädelknochen mit Phosphatzement fixiert. Die Veränderungen der Stromstärke im Registrationskreis, welche von der mit dem pO_2 wechselnden Polarisation der Platinelektrode abhängig sind, wurden als Potentialgefälle an einem 20 $K\Omega$-Widerstand in Serie mit der Platin- und der Kalomelelektrode, einem 1 $M\Omega$-Widerstand und einem Nife-Akkumulator von 1,2 V gemessen. Mittels eines Umschalters wurde dieses „Sauerstoffpotential" direkt in einem der Kanäle des EEG-Apparates in Form 0,5—1,0 sec dauernder Impulse registriert. Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet, sobald die pO_2-Kurve einen konstanten Wert erreicht hatte. Die Abnahme des O_2-Druckes nach dem Tode, die zu einer Erhöhung des Widerstandes der Platinelektrode führt und dadurch eine Verminderung der registrierten Spannung verursacht, wurde 5 min lang verfolgt. Die Potentialveränderung war in den ersten Sekunden nach dem Tode am schnellsten. Zu Ende der 2. min war ein neues Niveau erreicht, welches sich in der Folge nur wenig veränderte. Mit Rücksicht hierauf konnten wir die einzelnen Werte des während der 1. min auftretenden Spannungsabfalles als Prozente des Spannungsunterschiedes zwischen dem am Ende der 2. min nach der Dekapitation erreichten Wert und dem prämortalen Potential ausdrücken. Weil eine genauere Zuordnung der so ermittelten Potentiale zu den wirklichen pO_2-Werten mit großen methodischen Schwierigkeiten verknüpft ist, haben wir

auf absolute Messungen des pO_2 der Hirnrinde verzichtet und uns damit begnügt, die bei den Experimental- und den Kontrolltieren gewonnenen relativen Kurven miteinander zu vergleichen.

Ergebnisse

Zuerst wurde die Abhängigkeit der Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation von der Rectaltemperatur bei nicht narkotisierten Tieren untersucht. Diese Kontrollversuche, die in 3 Temperaturgruppen durchgeführt wurden, haben eine mit sinkender Körpertemperatur eintretende, statistisch gesicherte Verlängerung der Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation erwiesen. Weil nach der Applikation des Chlorpromazins

Tabelle 1

	Rectaltemperatur in °C	n	Halbzeit der anox. Terminaldepolarisation in sec	Residualpolarität der Hirnrinde 5 min nach Dekapitation in mV
Kontrolle	36	28	105,0 ± 6,8	1,9 ± 0,4
	30	29	119,0 ± 6,2	5,1 ± 0,6
	20	22	145,0 ± 6,2	5,4 ± 0,8
Chlorpromazin 20 mg/kg i.v.	30	27	145,8 ± 7,0	4,2 ± 0,5
Chlorpromazin 10 mg/kg i.v.	20	29	213,8 ± 16,4	6,3 ± 0,5
Dial 25 mg/kg i.v.	20	22	176,3 ± 6,2	4,3 ± 0,7

bei Ratten im Laufe von 2—3 Std eine spontane Senkung der Rectaltemperatur auf etwa 30° C eintritt, müssen wir diese Tiere mit der in Eiswasser auf 30° C Rectaltemperatur abgekühlten Kontrollgruppe vergleichen. Bei gleicher Körpertemperatur verlängert also Chlorpromazin statistisch signifikant die Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Ratten gewonnen, die 2 Std nach der Applikation des Chlorpromazins mittels Eiswassers auf 20° C abgekühlt wurden. Auch Dial (25 mg/kg i.v.) verlängerte die Halbzeit der Depolarisation wesentlich, ohne aber den Effekt des Chlorpromazins zu erreichen. Eine Gesamtübersicht aller dieser Ergebnisse enthält die Tab. 1. Abb. 2 zeigt in Einzelversuchen registrierte charakteristische Kurven der Terminaldepolarisation für eine normo- und eine hypothermische Kontrollratte (36° C und 20° C) sowie für eine nach Chlorpromazin hypothermische auf 20° C abgekühlte Ratte. Die Verlängerung der Halbzeit der Terminaldepolarisation ist freilich nicht das einzige Kriterium der Verlängerung des Überlebens der Hirnrinde; diese letztere dürfte nämlich eher mit der augenblicklichen Residualpolarität des Cortex im Zusammenhang stehen, welche vielleicht als ein Ausdruck der Wiederbelebungsfähigkeit der Hirnrinde betrachtet werden kann

Während die Residualpolarität der Hirnrinde bei 36° C Körpertemperatur 5 min nach der Dekapitation nur 1,9 ± 0,4 mV betrug, wurden bei Abkühlung auf 20° C an den Kontrollratten 5,4 ± 0,8 mV und an den mit Chlorpromazin vorbehandelten Ratten sogar 6,3 ± 0,5 mV gemessen.

Die Messung des pO_2 der Hirnrinde erfolgte bei Rectaltemperaturen von 19—22° C einerseits in 5 Kontrollversuchen, anderseits in 8 Versuchen bei Tieren, denen 2—3 Std vor der Dekapitation Chlorpromazin (10 mg/kg i.v.) appliziert worden war. Für die Auswertung wurden nur solche Versuche verwendet, in denen 2 min nach der Dekapitation eine Senkung des „O_2-Potentials" um 1—2 mV eingetreten war (welche für den normalen Verlauf der Versuche

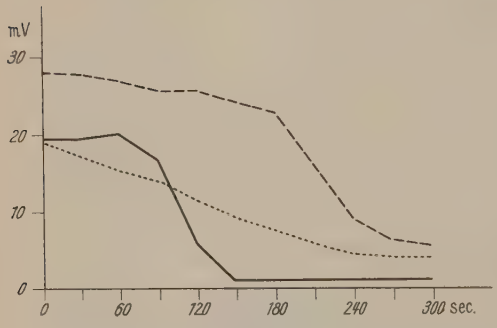


Abb. 2

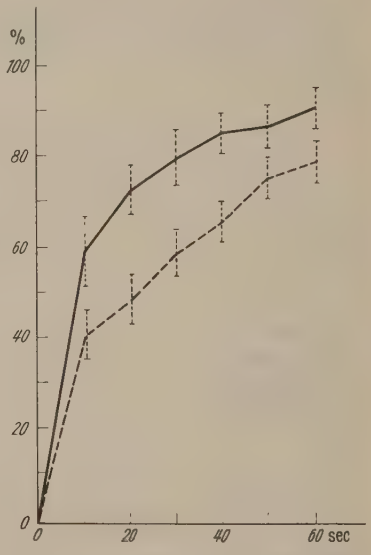


Abb. 3

Abb. 2. Verlauf der anoxischen Terminaldepolarisation in charakteristischen Einzelversuchen. Gestrichelte Kurve: nach Vorbehandlung von 10 mg/kg Chlorpromazin, 20° C Rectaltemperatur; Punktierte Kurve: Kontrollversuch bei 20° C; Durchgezogene Kurve: Kontrollversuch bei 36° C; Abszisse: die seit der Dekapitation verstrichene Zeit in Sekunden; Ordinate: Hirnrindenpolarität in mV.

Abb. 3. Senkung des polarographischen Sauerstoffstromes nach Dekapitation bei den Kontrollratten (durchgezogene Linie) und bei den mit 10 mg/kg Chlorpromazin vorbehandelten Ratten (gestrichelte Linie). Die einzelnen Durchschnittswerte (von 5 Kontrolltieren und 8 chlorpromazinbehandelten Ratten) sind in Prozenten der am Ende der 2. min erreichten Stromsenkung angegeben (Ordinate). Die senkrechten punktierten Linien geben die mittleren Fehler der Durchschnittswerte an. Abszisse: Zeit nach der Dekapitation in Sekunden

als charakteristisch gelten konnte). Wir können deshalb voraussetzen, daß das pO_2 der Hirnrinde bei diesen Tieren im Augenblick der Dekapitation ungefähr den gleichen Wert hatte. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 zusammengefaßt. Bei Ratten, denen Chlorpromazin appliziert wurde, kommt es zu einer langsameren pO_2-Abnahme als bei den Kontrollratten, und zwar besonders während der ersten 40 sec nach der Dekapitation. Von der 50. sec an ist der Unterschied im Verlauf der beiden Kurven für $P = 0{,}05$ nicht mehr statistisch signifikant. In der Zeit, in welcher sich die anoxische Terminaldepolarisation

erst zu entwickeln beginnt, nähert sich also der Sauerstoffdruck in der Hirnrinde schon dem Nullwert.

Die anoxische Terminaldepolarisation scheint daher ein Ausdruck des Zusammenbruches der anaeroben Prozesse des Strukturumsatzes (Gänshirt u. Mitarb. 1954) zu sein, welche von der Größe der am Anfang der akuten Ischaemisation in der Hirnrinde vorhandenen energetischen Vorräte abhängig sind.

Weil Glucose die wichtigste Energiequelle für das Zentralnervensystem darstellt, die durch keinen anderen Stoff unter normalen Bedingungen ersetzt werden kann (vgl. die ausführliche Literaturübersicht bei

Tabelle 2. *Die Abhängigkeit der Parameter der anoxischen Terminaldepolarisation von dem Blutzuckerspiegel und der Körpertemperatur*

	Durchschnittliche Körpertemperatur in °C	n	Durchschnittliche Glykämie in mg-%	Halbzeit der anox. Terminaldepolarisation in sec	Ausgangswerte der Hirnrindenpolarität in mV
Kontrolle	36	25	70	99,0 ± 5,9	18,3 ± 2,5
	20	11	70	146,0 ± 8,3	21,3 ± 0,9
Glucose 2 g/kg i.v.	36	11	über 200	126,0 ± 5,4	21,5 ± 2,0
	20	8	unter 225	140,1 ± 6,0	25,0 ± 2,1
	20	19	über 225	205,4 ± 11,7	24,8 ± 1,0
Insulin 0,1 IE/kg i.v.	36	11	unter 50	49,0 ± 3,6	15,3 ± 0,9
	20	8	unter 50	106,0 ± 5,6	15,4 ± 1,3

Höpker 1954), darf vermutet werden, daß nach einer vor der akuten Ischaemie des Gehirns erfolgenden Erhöhung des Blutzuckerspiegels, welche optimale Bedingungen für den Hirnmetabolismus sichert und jede Abschöpfung aus eigenen Quellen überflüssig macht, die anaerobe Glykolyse sowie die Rindenpolarität nach dem Tode länger anhalten könnte als bei einem Tier mit normalem oder gar mit gesenktem Blutzuckerspiegel.

Die Richtigkeit dieser Voraussetzung wurde durch Versuche erwiesen, welche in Tab. 2 zusammengefaßt sind. Die Erhöhung der Glykämie über 200 mg-% führt bei den normothermischen Tieren (36° C) zu einer Verlängerung der Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation, während die durch Insulin hervorgerufene Erniedrigung der Glykämie eine beträchtliche Beschleunigung der Depolarisation verursacht.

Ein analoges Ergebnis wurde bei den hypothermischen (20° C) Tieren erhalten: Der Verlauf der Terminaldepolarisation war in allen 3 Gruppen verlangsamt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (siehe Tab. 1) kommt es zu einer statistisch signifikanten ($P = 0{,}001$) Verlängerung der

Halbzeit der Terminaldepolarisation erst bei Tieren, deren Blutzuckerspiegel 225 mg-% erreicht. Eine kleinere Erhöhung der Glykämie verlängert die Halbzeit nicht. Hypoglykämie hat wiederum eine Verkürzung der Halbzeit zur Folge.

Aus Tab. 2 folgt weiter, daß auch die Ausgangswerte der Hirnrindenpolarität in gewissem Ausmaß durch den Blutzuckerspiegel beeinflußt werden. Während die hyperglykämischen Tiere das höchste Ausgangspotential haben, wird bei den hypoglykämischen Ratten das niedrigste Ausgangspotential gefunden. Der Unterschied zwischen den Ausgangspotentialen der hypo- und hyperglykämischen Tiere ist bei 36° C Rectaltemperatur statistisch gesichert für $P = 0{,}05$, bei 20° C für $P = 0{,}001$.

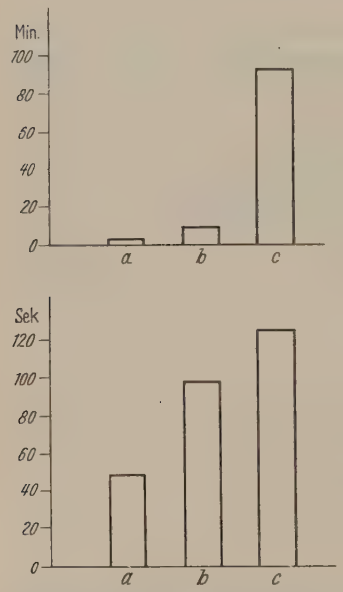


Abb. 4. Überlebenszeiten bei Höhenanoxie nach Britton u. Kline (oben) und die Halbzeiten der anoxischen Terminaldepolarisation der Hirnrinde bei den normothermischen Ratten (unten) mit Hypo- (*a*), Normo- (*b*) und Hyperglykämie (*c*)

Um den Zusammenhang unserer Resultate mit der Höhe der Glucosevorräte im Hirngewebe zu prüfen, haben wir bei 11 Ratten Versuche mit einer lokalen Applikation der Glucose auf die Hirnrindenoberfläche durchgeführt. Das mit Glucose behandelte Gebiet wies im Vergleich zum Kontrollgebiet eine langsamere Erniedrigung des Potentials der Hirnrinde auf ($P = 0{,}01$). Die Halbzeit der Terminaldepolarisation wurde in dem mit Glucose behandelten Gebiet um $22{,}7 \pm 5{,}1$ sec verlängert.

In einer letzten Versuchsreihe haben wir den Blutzuckerspiegel nach einer Dosis von 10 mg/kg Chlorpromazin i.v. bei verschiedenen Körpertemperaturen mit jenen der Kontrolltiere verglichen. Nach der Applikation des Chlorpromazins kommt es mit absinkender Temperatur zu einer erheblichen Erhöhung des Blutzuckerspiegels, während bei den Kontrolltieren eine Abkühlung auf 20° C fast keine Änderung der Glykämie ergibt (siehe Tab. 3).

Besprechung

Aus den Ergebnissen unserer Versuche folgt, daß der günstige Einfluß der erniedrigten Körpertemperatur auf das Überleben der Hirnrinde, der schon in unserer vorigen Arbeit beschrieben wurde (Bureš, Burešová 1957), durch die Applikation des Chlorpromazins bedeutsam weiterverstärkt wird.

Unsere Experimente stehen im Widerspruch mit einem Teil der in der Einleitung zitierten Literatur. Es ist schwer, für diese Widersprüche, die nur zum Teil auf die Verschiedenheit der benützten Methodik respektive auf die Bedingungen, unter welchen die Beurteilung der Resultate erfolgte, zurückgeführt werden können, eine völlig befriedigende Erklärung zu finden. Wie aus unseren Versuchen hervorgeht, ist die Wirksamkeit des Chlorpromazins bei 20° C viel deutlicher ausgesprochen als bei 30° C. Die von uns festgestellten Unterschiede gelten nur für die Hirnrinde und beziehen sich daher nicht auf die subcorticalen Gebiete. Schließlich bleibt auch noch die Frage ungeklärt, welche Beziehungen

Tabelle 3. *Die Veränderungen des Blutzuckerspiegels in Abhängigkeit von der Körpertemperatur bei Kontrollratten und nach Applikation von 10 mg/kg Chlorpromazin i.v.*

Rectaltemperatur		36° C	30° C	20° C
Kontrolle	Glykämie mg-%	66,5		68,0
	Glykämiezunahme mg-%			1,5
Chlorpromazin 10 mg/kg i.v.	Glykämie mg-%	66,8	112,2	152,7
	Glykämiezunahme mg-%		55,4 ± 7,3	40,5 ± 9,0

zwischen der anoxischen Terminaldepolarisation (respektive ihrer Halbzeit) und den anderen Kriterien des Überlebens der Gehirnfunktionen bestehen. Wenn auch feststeht, daß die Halbzeit der Terminaldepolarisation den absoluten Werten der Wiederbelebungszeit näherkommt als die anderen heute angewendeten Kriterien der Überlebensdauer, so wird es trotzdem in Zukunft nötig sein, diese Beziehungen durch Wiederbelebungsversuche zu präzisieren.

Die Erklärung der Chlorpromazinwirkung kann man teilweise in der Erniedrigung des Gehirnumsatzes suchen, die sich auch in unseren Versuchen nach der Dekapitation durch einen verminderten O_2-Verbrauch bemerkbar machte. Dieser Unterschied verschwindet aber schon am Ende der ersten Minute nach der Dekapitation und ist zu klein, als daß mit ihm die unter diesen Bedingungen mehr als 1 min andauernde Verlängerung der Halbzeit der Terminaldepolarisation erklärt werden könnte. Während der Entwicklung der anoxischen Terminaldepolarisation kann es nur noch der anaerobe Umsatz sein, welcher die Hirnrinde wiederbelebungsfähig erhält.

Aus den Resultaten unserer Versuche ist zu ersehen, daß der Blutzuckerspiegel einer der wichtigsten unter jenen Faktoren ist, welche die Schnelligkeit der Entwicklung der anoxischen Terminaldepolarisation

bestimmen. Während der niedrige Blutzuckerspiegel die anoxische Terminaldepolarisation beschleunigt, wird sie bei Ratten mit hohem Blutzuckerspiegel deutlich verlangsamt. Diese Wirkung der Hypoglykämie wird bei erniedrigter Körpertemperatur noch gesteigert.

Diese Resultate stehen in guter Übereinstimmung mit den Versuchen von Himvich u. Mitarb. (1943). Ratten, die ein Gasgemisch mit 4,5% O_2 atmeten, überlebten 27 min; wenn ihnen 1 Std vor der Anoxie Insulin verabreicht wurde, überlebten die Ratten nur 15 min. Bei jungen Ratten (8 Tage alt) konnte im reinen Stickstoff die Überlebenszeit durch Glucoseinjektion und nachfolgende Hyperglykämie verlängert werden. Britton u. Kline (1945) fanden bei Höhenanoxie ein ähnliches Verhältnis der Überlebenszeiten zwischen den Kontrolltieren und jenen Ratten, die entweder Glucose oder Insulin bekommen hatten. In Abb. 4 werden die Resultate von Britton u. Kline mit den unsrigen verglichen. Der Verlauf der Terminaldepolarisation ist dem Gesagten zufolge von den Glucosevorräten und der anaeroben Energieproduktion im Gehirn abhängig.

Für die engen Beziehungen zwischen dem Metabolismus der Glycide und der Hirnrindenpolarität spricht auch die Tatsache, daß die durch Insulin hervorgerufene Hypoglykämie zu einer statistisch gesicherten Senkung der Hirnrindenpolarität führte, und zwar bei normaler sowie, auch bei erniedrigter Körpertemperatur.

Als optimale Bedingungen für die Verlangsamung der anoxischen Terminaldepolarisation können wir deshalb eine Erniedrigung der Körpertemperatur (welche die enzymatischen Vorgänge im Hirngewebe verlangsamt) sowie die möglichst große Erhöhung der Glucosevorräte im Gehirn nennen. Die Tatsache, daß es sich wirklich um eine günstige Wirkung der Glucose handelt, bestätigen unsere Versuche mit lokaler Applikation der Glucose auf die Hirnrindenoberfläche.

Bei auf 20° C abgekühlten Tieren wurde durch eine Glucoseinjektion die gleiche Wirkung auf das mittels unserer Methodik beurteilte Überleben des Hirngewebes erzielt wie durch Applikation von 10 mg/kg Chlorpromazin i.v. Wir haben gezeigt, daß Chlorpromazin in dieser Dosis beim Tier eine Hyperglykämie hervorruft, die mit der absinkenden Körpertemperatur noch gesteigert wird. Ein ähnliches Resultat haben Norman u. Hiestand (1955) bei Mäusen und Hamstern und Draškoci u. Lero (1956) bei Kaninchen gewonnen; ebenso fanden auch Giaja u. Mitarb. (1955) sowie Bamdas u. Mitarb. (1956) eine Hyperglykämie, die sich parallel mit der Dosis des Chlorpromazins erhöht. Eine solche Wirkung muß nicht eine direkte sein, sondern sie kann durch die sedative und ganglioplegische Wirkung des Chlorpromazins vermittelt werden, welche es ermöglicht, daß bei chlorpromazinbehandelten Tieren eine tiefe Abkühlung unter geringerer Inanspruchnahme der Regulationsmechanismen

und dementsprechend unter relativer Schonung der energetischen Reserven der Gewebe erzielt wird (Cazzulo, Guareschi 1954). Besonders kann hier die Verminderung der chemischen Thermoregulationsarbeit, welche das normale Tier zur Kompensation einer durch schnelle Abkühlung hervorgerufenen Störung der physikalischen Thermoregulation aufbietet, eine entschiedene Bedeutung gewinnen. In ähnlichem Sinne sprechen auch unsere Ergebnisse mit Dial.

Die Hyperglykämie, die bei den abgekühlten Tieren durch Chlorpromazin hervorgerufen wurde, kann aber allein dessen günstige Wirkung auf die Entwicklung der anoxischen Terminaldepolarisation nicht erklären. Die Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation unterscheidet sich nämlich bei den hypothermischen Tieren mit einem Blutzuckerspiegel unterhalb 225 mg-% nicht von der Halbzeit der normoglykämischen Tiere, und die durch Chlorpromazin hervorgerufene Erhöhung der Glykämie erreicht gewöhnlich nicht einmal dieses Niveau (der durchschnittliche Blutzuckerspiegel ist 152 mg-%). Trotzdem darf vermutet werden, daß Chlorpromazin, ganz abgesehen von seiner Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch und die oxydative Phosphorylation (Gänshirt, Brilmayer 1954) sowie anderen komplexen Effekten, durch die von ihm hervorgerufene Erhöhung des Blutzuckerspiegels einen beträchtlichen Einfluß auf die anoxische Terminaldepolarisation ausübt.

Wenn auch derzeit die metabolische Deutung unserer Beobachtungen noch nicht gesichert ist, kann man annehmen, daß sich in der Klinik durch eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels im Laufe der Vorbereitung oder der eigentlichen Durchführung der Hibernisation die Schutzwirkung dieser Eingriffe auf die vorübergehend anämisierten Hirngebiete verbessern ließe.

Zusammenfassung

Die anoxische Terminaldepolarisation (die langsame Abnahme des Potentialunterschiedes zwischen einem durch Thermokoagulation zerstörten Rindengebiet und der normalen Hirnrindenoberfläche unter den Bedingungen der akuten Anoxie oder Ischämie) wird als ein Indicator für das Überleben der Hirnrinde der Ratte nach der Dekapitation benützt.

Zur Erniedrigung der Ausgangspolarität der Hirnrinde auf die Hälfte (die Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation) kam es bei den Tieren mit 36°, 30° bzw. 20° C Rectaltemperatur in 105,6 ± 6,8 sec, 119,0 ± 6,2 sec bzw. 145,0 ± 6,2 sec nach der Dekapitation. Bei Ratten, denen 2 Std vor der Dekapitation Chlorpromazin in einer Dosis von 10—20 mg/kg i.v. appliziert wurde, verlängerte sich bei 30° respektive 20° C Rectaltemperatur die Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation auf 145,8 ± 7,0 sec respektiv 213,8 ± 16,4 sec. Eine ähnliche,

wenn auch nicht so deutlich ausgesprochene Wirkung hatte Dial (25 mg/kg i.v.).

Bei jenen Ratten, denen Chlorpromazin appliziert worden war, erfolgt die nach der Dekapitation eintretende pO_2-Abnahme in der Hirnrinde langsamer als bei den Kontrolltieren (polarographische Messungen mit Hilfe einer Platinkathode). Die Halbzeit der anoxischen Terminalpolarisation war bei den nicht narkotisierten normo- und hypothermischen Ratten, welchen 30—40 min vor der Dekapitation Glucose 2 g/kg i.v. appliziert worden war und deren Blutzuckerspiegel mehr als 200 mg-% erreicht hatte, statistisch signifikant länger als bei den Kontrolltieren mit einer durchschnittlichen Glykämie von 70 mg-%.

Die Erniedrigung der Glykämie durch Insulin auf Werte unter 50 mg-% verminderte die Ausgangswerte der Hirnrindenpolarität und verkürzte signifikant die Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation sowohl bei den normo- als auch bei den hypothermischen Ratten.

Auch in einem lokal mit 20% Glucose behandelten Gebiet der Hirnrindenoberfläche wurde die Halbzeit der anoxischen Terminaldepolarisation verlängert.

Chlorpromazin 10 mg/kg i.v. erhöht bei gleichzeitiger Abkühlung der Ratten auf 20° C Rectaltemperatur die Glykämie bis auf 152 mg-%. Der Anteil der auf diese Weise hervorgerufenen Hyperglykämie im Wirkungsmechanismus des Chlorpromazins wird diskutiert.

Literatur

Ankermann, H.: Pharmazie **11**, 542 (1956). — Bamdas, B. S., G. D. Glod, L. I. Lando, A. P. Levkovič, G. K. Tarasova u. I. N. Chazen: Žurnal nevropatologii i psich. im. Korsakova **56**, 121 (1956). — Berger, M., H. J. Strecker and H. W. Waelsch: Nature (Lond.) **177**, 1234 (1956). — Bernsmeier, A.: Anaesthesist **3**, 149 (1954). — Bernsmeier, A., u. M. Gottstein: Pflügers Arch. **263**, 102 (1956). — Bernsohn, J., I. Namajnska and L. Cochrane: Arch. of Biochem. a. Biophysics **62**, 274 (1956). — Berti, T., e A. Balestrieri: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **29**, 632 (1953). — Britton, S. W., and R. F. Kline: Amer. J. Physiol. **145**, 190 (1945). — Bureš, J.: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **9**, 121 (1957). — Bureš, J., u. O. Burešová: Pflügers Arch. **264**, 325 (1957). — Century, B., and M. K. Horwitt: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **91**, 493 (1956). — Courvoisier, S., J. Fournel, R. Duerot, M. Kolsky and P. Koetschet: Arch. int. pharmacodynamie. **92**, 305 (1953). — Davies, P. W., and F. Brink jr.: Rev. Sci. Instr. **13**, 524 (1942). — Davies, P. W., and A. Rémond: Res. Publ. Ass. Rev. Nerv. Dis. **26**, 205 (1947). — Draškoci, M., u. J. Lero: Acta Pharm. Jug. **6**, 3 (1956). — Finkelstein, M., W. A. Spencer and E. R. Ridgeway: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **87**, 343 (1954). — Frowein, R. A., H. Hirsch, D. Kayser u. W. Krenkel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 52 (1955). — Gänshirt, H., et H. Brilmayer: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 467 (1954). — Gänshirt, H., H. Hirsch, W. Krenkel, M. Schneider u. W. Zylka: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 431 (1954). — Giaja, J., L. Markovič-Giaja et V. Pavlovič: Arch. internat Physiol. **83**, 413 (1955). — Grennel, R. G., J. Mendelson and W. D. McElroy: Arch. of Neur. **73**, 347

(1954). — Guareschi, A., e C. L. Cazzullo: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **30**, 22 (1954). — Harreveld, A. van, and J. S. Stamm: Amer. J. Physiol. **173**, 171 (1953). — Himwich, H. E., J. F. Fazekas and E. Homburger: Endocrinology (Springfield, Ill.) **33**, 96 (1943). — Himwich, H. E.: Brain Metabolism and Cerebral Disorders. Baltimore (USA) 1951. — Höpker, W.: Die Wirkung des Glucosemangels auf das Gehirn. Leipzig 1954. — Ketty, S. S., and C. F. Schmidt: J. Clin. Invest. **27**, 476 (1948). — Kok, K.: Acta physiol. et pharmacol. Neerl. (Amsterd.) **5**, 1 (1956). — Laborit, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 41 (1954). — Leao, A. A. P.: J. of Neurophysiol. **10**, 409 (1947). — Norman, David, and W. A. Hiestand: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **90**, 89 (1955). — Nelson Norton: J. of Biol. Chem. **153**, 375 (1944). — Schneider, M.: XX. Int. Physiol. Congress. Abstracts of Reviews, S. 98. Brussels 1956. — Schostok, P.: Anaesthesist **3**, 195 (1954). — Wiemers, K., u. E. G. Kaniak: Anaesthesist **3**, 151 (1954).

Dr. O. Burešová, Physiol. Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag 6, Na Cvičišti 2

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 562—567 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Zur Beeinflussung des Rattenpfotenödems durch die Narkose

Von
G. Hertting und E. Stoklaska

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Juli 1957)

Zur Testung antiphlogistisch wirkender Substanzen wird in zunehmendem Maße das experimentell erzeugte Rattenpfotenödem benützt. Dieses wird sowohl an wachen als auch — der leichteren Messung wegen — an narkotisierten Tieren erzeugt. In der Literatur fehlen jedoch eindeutige Angaben über den Einfluß der Narkose auf den Ödemverlauf, da genaue vergleichende Untersuchungen an wachen und narkotisierten Tieren nicht durchgeführt wurden. Nach Wilhelmi u. Domenjoz (1951) übt die von ihnen angewandte Narkose (Numal 100 mg/kg s. c.) keinen wesentlichen Einfluß auf die Ödembildung aus, wobei eine entsprechende vergleichende Beurteilung der Schwellung nur nach dem Augenmaß vorgenommen wurde. Auch nach der ausgedehnten Erfahrung von Wilhelmi (zitiert bei Domenjoz 1955) ergibt sich nie ein qualitativer Unterschied zwischen Pfotenödemen bei wachen und mit Numal narkotisierten Tieren. Riechert u. Barghorn (1954) hingegen fanden bei der Avertinnarkose eine zeitliche Verzögerung in der Entwicklung des Hühnereiweißödems; den Ödemgrad beurteilten sie durch Inspektion.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung der meist geübten Narkose mit Numal 100 mg/kg s. c. auf das häufig verwendete Dextran- und Formolödem festzustellen. Zur Schwellungsbestimmung wählten wir eine gut reproduzierbare Meßmethode, die es erlaubt, den Ödemverlauf in gleicher Weise bei wachen und narkotisierten Tieren über einen längeren Zeitraum quantitativ zu erfassen.

Methodik

Als Versuchstiere verwendeten wir weibliche Albino-Ratten eines Glaxo-Inzuchtstammes im Gewicht von 180—260 g. Vor Versuchsbeginn standen die Tiere mindestens 3 Tage unter normalen Laboratoriumsbedingungen. Die Ernährung bestand aus Rattenkeks (Lembeck 1953) und Trinkwasser ad libitum.

Die Untersuchungen wurden im Abstand von 6 Wochen in zwei Versuchsserien an insgesamt 20 nicht narkotisierten und 52 narkotisierten Tieren durchgeführt.

Diesen injizierten wir 1 Std vor Erzeugung des Ödems 100 mg/kg des Diäthylaminsalzes der Allylisopropylbarbitursäure („Numal-Roche") subcutan. Einem Wärmeverlust der narkotisierten Tiere wurde vorgebeugt.

Zur Erzeugung des Ödems injizierten wir die entzündungserregenden Substanzen in die tieferen Gewebsschichten der Hinterpfoten, wobei wir eine Injektionskanüle Nr. 20 mit kurzer Spitze zwischen zweiter und dritter Zehe einstachen und sie etwa 5 mm weit vorschoben. Diese Art der Injektion bedingt eine geringere Streuung der Schwellungswerte als eine Applikation in die oberflächlichen Pfotenpartien. Beim gleichen Tier injizierten wir in die eine Pfote 0,1 ml einer 1%igen Formollösung, in die andere 0,1 ml einer 6%igen Dextranlösung (Makrodex Knoll).

Zur Bestimmung der auftretenden Schwellung maßen wir in Anlehnung an die Methode von Courvoisier u. Ducrot (1955) die dorso-plantare Dicke der Pfote. Wir benützten dazu ein Dickenmeßgerät der Fa. Käfer (Schwenningen) Type J 50 mit der Tasterform c. Die Planta der von einer Hilfsperson gehaltenen Ratte wurde dabei leicht und flach auf die kreisförmige untere Fläche des Tasters angedrückt, die Zehenwurzeln schnitten mit deren Begrenzungslinie ab. Um den diesem Gerät eigenen konstanten, für unsere Zwecke jedoch zu großen Auflagedruck seitens der oberen Tasterfläche zu verringern, wurde an den Hebel des Gerätes ein Verlängerungsstück mit einem Laufgewicht angebracht und der Auflagedruck auf 20 g eingestellt.

Zur Erfassung des Ablaufes des Ödems wurden Messungen unmittelbar nach der Injektion, nach 30, 60 und 90 min, sowie nach 2, 3, 4, 5, 8 und 24 Std vorgenommen.

Als Ausgangswert der Schwellung (= Nullinie auf den Abbildungen) nahmen wir die Dicke der Pfote unmittelbar nach der Injektion. Dadurch ist nach längerer Beobachtungszeit beim rasch abklingenden Dextranödem das Auftreten von Werten unter dem Ausgangswert (= negative Werte) möglich. Die Mittelwerte der Differenzen zwischen den Schwellungswerten nach den angeführten Zeitabständen und dem Ausgangswert sowie die mittleren Fehler der Mittelwerte wurden bestimmt und kurvenmäßig festgehalten.

Ergebnisse

Bei Beachtung der in der Methodik angegebenen Kriterien sowie einiger Übung erwies sich die von uns verwendete Methode als zuverlässig; die mit ihr erhaltenen Werte waren gut reproduzierbar: die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen stimmten voll und ganz überein. Die mittleren Fehler der Mittelwerte lagen in der Regel unter 5% und waren nur zum Zeitpunkt des Schwellungsbeginnes sowie des Ausklingens höher. Diese Streuung ist auf die verschieden starke Ausbildung des Ödems bei den einzelnen Tieren zurückzuführen und nicht auf den Meßvorgang an sich, wie wiederholte Messungen an der gleichen Pfote gezeigt haben.

Bezüglich des Einflusses der zu prüfenden Numalnarkose auf die Versuchsergebnisse ist zunächst zu erwähnen, daß ein beträchtlicher Teil der narkotisierten Versuchstiere während der Versuchsdauer ad exitum kam. Wie Tab. 1 zeigt, waren nach 5 Std bereits etwa 50% der Tiere verstorben. Einen Zeitraum von 24 Std überlebten von 52 Tieren nur 21, das sind 40,4%. Diese zeitlichen Verhältnisse beim Absterben der Versuchstiere trotz der von uns geübten Vorsichtsmaßnahmen lassen annehmen, daß der Tod eine direkte Narkosefolge war und nicht durch irgendwelche sekundär aufgetretenen Veränderungen verursacht wurde.

Die Abb. 1 und 2 zeigen den Verlauf des Dextran- bzw. Formolödems bei den wachen und bei den 24 Std überlebenden narkotisierten Ratten. Das Dextranödem (Abb. 1) erreicht beim nicht narkotisierten Tier nach steilem Anstieg bereits nach 30 min seinen Maximalwert und nimmt von diesem Zeitpunkt an stetig ab (spitzgipfelige Kurve). Nach 24 Std erreicht die Schwellung schon einen unter dem Ausgangsniveau liegenden Wert. Demgegenüber ist die Entwicklung der Schwellung beim narkotisierten Tier verzögert, der Anstieg erfolgt etwas weniger steil, der maximale Wert wird erst nach 60 min erreicht, liegt aber in der gleichen Größenordnung wie bei wachen Tieren. Die Schwellung bleibt dann 3 Std lang auf diesem Werte bestehen und beginnt erst nach 4 Std deutlich abzufallen (plateauartige Kurve). Nach 24 Std liegt hier die Schwellung noch weit über dem Ausgangswert.

Tabelle 1. *Zahl der überlebenden Tiere nach Numalnarkose* (100 mg/kg s. c.)

Zeit nach der Ödemerzeugung	Zahl der überlebenden Tiere	Überlebende Tiere in % der verwendeten
30 min	52	100,0
60 „	52	100,0
90 „	51	98,1
2 Std	45	86,5
3 „	32	61,5
4 „	28	53,8
5 „	27	51,9
8 „	23	44,2
24 „	21	40,4

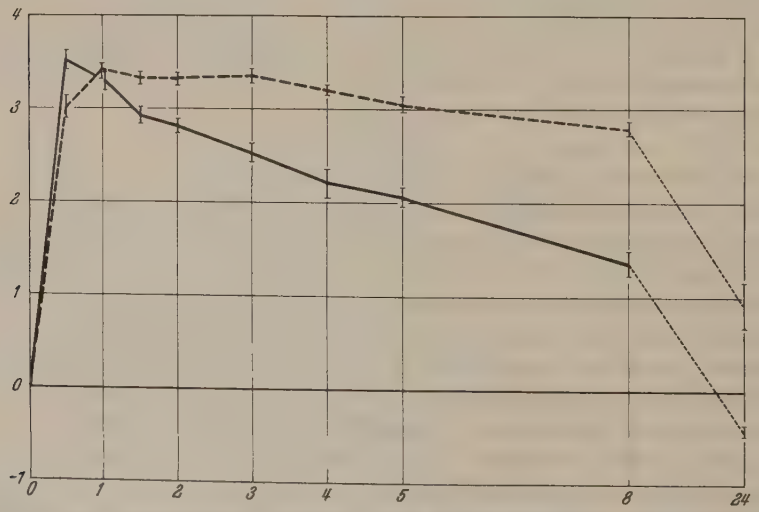


Abb. 1. Verlauf des Dextranödems bei wachen (——) und narkotisierten (----) Tieren. *Ordinaten:* mittlere Zunahmen der dorso-plantaren Pfotendurchmesser in Millimeter und mittlere Fehler der Mittelwerte. *Abszissen:* Zeitintervalle in Stunden nach Injektion von 0,1 ml einer 6%igen Dextranlösung

Der Verlauf des Formolödems bei wachen und narkotisierten Tieren ist in Abb. 2 wiedergegeben. Bei beiden Versuchsgruppen erfolgt die Ausbildung der Schwellung wesentlich langsamer als beim Dextranödem. Die Maxima wurden erst nach 5—8 Std erreicht; sie sind von ungefähr gleicher Größe. Auch der Abfall ist ein nur allmählicher, flacher, und nach 24 Std liegen die Schwellungswerte weit über dem Ausgangswert.

Während demnach der über 24 Std verfolgte Ablauf des Dextranödems durch die Narkose eine entscheidende Veränderung erfährt,

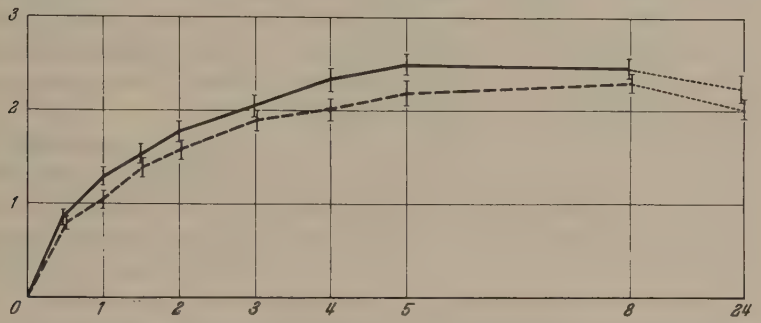


Abb. 2. Verlauf des Formolödems bei wachen (——) und narkotisierten (----) Tieren. *Ordinaten;* mittlere Zunahmen der dorso-plantaren Pfotendurchmesser in Millimeter und mittlere Fehler der Mittelwerte. *Abszissen:* Zeitintervalle in Stunden nach Injektion von 0,1 ml einer 1%igen Formollösung

beeinflußt diese den Verlauf des Formolödems nur wenig. Noch eindeutiger wären diese Ergebnisse, wenn wir zur Erstellung der Kurven nicht nur die 24 Std überlebenden Tiere herangezogen hätten.

Diskussion

Eine gleichzeitige Erzeugung eines Ödems mit Dextran in der einen und mit Formol in der anderen Hinterpfote bei ein und derselben Ratte bedingt nach Domenjoz et al. (1955) ein geringeres Ausmaß beider Schwellungen als bei Anwendung nur einer der beiden Substanzen; dies dürfte jedoch bei vergleichenden Untersuchungen die Ergebnisse nicht beeinflussen.

Mit der angegebenen Methode bestimmten wir zwar nur die Zunahme des dorso-plantaren Durchmessers der Rattenpfote, wie dies bereits von Brownlee (1950) sowie Courvoisier u. Ducrot (1955) geübt wurde. Bei einer quantitativen Erfassung des Ödemgrades dürfte dies jedoch gegenüber einer volumetrischen Messung keinen Nachteil bedeuten, da sich die Schwellung der Pfote vor allem in einer Zunahme eben dieses Durchmessers manifestiert. Die Streuung der mit unserer Methode gewonnenen Werte ist geringer als bei der plethysmographischen (Wilhelmi u. Domenjoz 1951). Gegenüber anderen Dickenmeßmethoden

bietet unser Meßgerät den Vorteil, mit einem entsprechend gewählten, konstanten Auflagedruck seiner beweglichen Tasterfläche arbeiten zu können und ermöglicht somit die Ausschaltung einer subjektiven Beeinflussung des Meßvorganges. Dadurch wird einem — noch dazu von Fall zu Fall verschieden starken — Eindrücken der geschwollenen Pfote vorgebeugt.

Da die Entzündungsversuche bei der von uns verwendeten Methode ohne Narkose durchgeführt werden, ist es möglich, den Verlauf eines Ödems über einen beliebig langen Zeitraum quantitativ zu verfolgen.

Der Wegfall der häufig geübten Numalnarkose stellt auch insofern einen Vorteil dar, als wir zeigen konnten, daß die Verabreichung von 100 mg/kg Numal s. c. schon nach relativ kurzer Dauer eine hohe Mortalität der Versuchstiere zur Folge hat.

Auch der Ödemverlauf an sich wird durch die Narkose beeinflußt: das Dextranödem zeigt eine gegenüber wachen Tieren völlig andere Verlaufsform, das Formolödem hingegen läuft bei narkotisierten und wachen Tieren zwar prinzipiell in der gleichen Weise ab, doch liegen nach entsprechenden Zeiten sämtliche bei narkotisierten Tieren gemessenen Werte unter denen der wachen Tiere. Diese unterschiedliche Wirkung der Narkose auf die beiden Ödemarten muß sicherlich auf die Verschiedenheit des biologischen Mechanismus der beiden Entzündungsarten zurückgeführt werden.

Bei Prüfung einer entzündungshemmenden Substanz an narkotisierten Tieren würde demnach der Ödemverlauf nicht nur durch das Antiphlogisticum, sondern auch durch die Narkose verändert werden. Ist diese Interferenz der Wirkungen schon zweifellos störend, so wird die Beurteilung des entzündungshemmenden Effektes noch durch den Umstand erschwert, daß nach Untersuchungen von Domenjoz et al. (1957) die Numalnarkose auch die Wirkung des Antiphlogisticums beeinflussen kann aber nicht muß.

All dies sowie der Umstand, daß zur Erreichung einer genügend tiefen Numalnarkose Dosen nötig sind, die — wie wir in Übereinstimmung mit Vogt (1930) zeigen konnten — praktisch einer DL 50 entsprechen, lassen die Testung entzündungshemmender Substanzen am wachen Tier zweckmäßig erscheinen.

Zusammenfassung

1. Es wurde festgestellt, daß die oft geübte Numalnarkose — entgegen den Angaben in der Literatur — den Verlauf des Dextran- bzw. Formolödems der Rattenpfote beeinflußt.

2. Zur Bestimmung des Ödemgrades wurde mittels eines Dickenmeßgerätes der dorso-plantare Durchmesser der Rattenpfote gemessen. Diese Methode erlaubt es, auch ohne Anwendung einer Narkose den

Ödemverlauf über einen beliebig langen Zeitraum quantitativ zu erfassen.

3. Die Testung entzündungshemmender Substanzen an nicht narkotisierten Tieren wird daher für zweckmäßig erachtet.

Literatur

Brownlee, G.: Lancet I, 157 (1950). — Courvoisier, S., et R. Ducrot: Arch. internat. Pharmacodynamie **102**, 33 (1955). — Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 14 (1955). — Domenjoz, R., W. Theobald u. K. Mörsdorf: Arzneimittel-Forsch. **5**, 488 (1955). — Domenjoz, R., K. Mörsdorf, E. G. Stenger u. W. Theobald: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 325 (1957). — Lembeck, F.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 50 (1953). — Riechert, W., u. H. Barghorn: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 489 (1954). — Vogt, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **152**, 341 (1930). — Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Arzneimittel-Forsch. **1**, 151 (1951).

Dr. G. Hertting, Pharmakolog. Institut der Universität, Wien IX/71 (Österr.), Währingerstr. 13a

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 568—576 (1957)

Aus dem Institut für Experimentelle Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
(Direktor: Professor Dr. med. Franz Palme)

Quantitative Analyse der Blutdruckwirkung des Präparates „Megaphen (Bayer)“* **

Von
W. Kalkoff

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Juli 1957)

Zur Frage der Blutdruckbeeinflussung durch Megaphen liegt bereits eine beachtliche Zahl von tierexperimentellen und klinischen Beobachtungen vor. Im allgemeinen herrscht soweit Übereinstimmung, daß selbst bei langdauernden und schweren operativen Eingriffen die Kontrollkurven des Blutdruckes gleichförmig und durch Megaphen scheinbar unbeeinflußt verlaufen (Courvoisier u. Mitarb.; Zürn; Duisberg u. Spitzbarth; Jourdan u. Mitarb.). Man spricht deshalb im Schrifttum hin und wieder von einer „Stabilisierung des Blutdruckes“ durch Megaphen (Wiemers u. Kaniak), ohne sich zwar über das Wesen und die tieferen Zusammenhänge dieser auch von amerikanischer Seite (Maurice, Mathews, Moyer sowie Bartis u. Mitarb.) mit Chlorpromazin bestätigten Tatsache hinreichend Klarheit verschaffen zu können. („Chlorpromazin“ ist identisch mit Megaphen, Largactil, Präp. 4.560 R.P.)

Die Prüfung der Blutdruckwirksamkeit eines Pharmakon mit relativ einfachem Wirkungsmechanismus, für das sich im pressoreceptorischen Funktionskreis nur ein einziger wesentlicher Angriffspunkt definieren läßt, mag methodisch verhältnismäßig unproblematisch sein. Schon mit einfacheren Testmethoden können im allgemeinen für eine Interpretation der Blutdruckwirkung ausreichende Ergebnisse erzielt werden. Dagegen wird man bei der Urteilsbildung über den Wirkungsmechanismus auf erhebliche Schwierigkeiten stoßen, wenn das zu prüfende Pharmakon nicht nur an einem, sondern an verschiedenen Organen bzw. Organsystemen angreift, z. B. im pressoreceptorischen Funktionskreis an verschiedenen Teilstrecken (zentral und peripher). Es drängt sich dann die Frage auf, ob am Zustandekommen von eventuell erkennbaren Änderungen der Blutdruckhöhe alle Angriffspunkte gleichermaßen beteiligt sind oder einzelnen Punkten eine nur zweitrangige Bedeutung zukommt.

---

* Meinem verehrten Lehrer, Prof. Dr. F. Palme zum 50. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise vorgetragen anläßlich der 21. Tagung der Dtsch. Pharmakolog. Ges. vom 3.—6. Oktober 1954 in Saarbrücken.

Mit diesen Möglichkeiten und den damit verbundenen Beurteilungsschwierigkeiten muß man zweifellos beim Megaphen rechnen, da von ihm außer einem zentralen blutdruckwirksamen Angriff (Cathala u. Pocidalo) auch mehrere periphere Wirkungen bekannt sind (Courvoisier u. Mitarb.; Decourt, Brunaud u. Brunaud sowie Jourdan u. Mitarb.). Die einfacheren Untersuchungsmethoden werden unter so unübersichtlichen Verhältnissen eine quantitative *Bewertung* der verschiedenen Angriffspunkte im Hinblick auf ihre anteilmäßige Bedeutung kaum ermöglichen. Dagegen verspricht unseres Erachtens die Prüfung der Blutdruckwirksamkeit des Megaphen mit Hilfe der Blutdruckcharakteristik eine gewisse Klärung dieser Frage.

Methodik

An 9 mit Morphin (0,01 g/kg)-Urethan (0,25 g/kg)-Grundnarkose betäubten Hunden wurde methodisch der bereits in früheren Mitteilungen eingehend beschriebene Untersuchungsweg eingeschlagen (Palme; Palme u. Vogel; Kalkoff; Marx u. Barner-Brückner; Kalkoff u. Blech; Palme u. Kalkoff).

Nach operativer Freilegung beider Carotiden wurde einseitig ein Carotissinus-Präparat angelegt, dessen Innendruck mit der von Eb. Koch angegebenen Druckapparatur variiert werden konnte. Endosinualer Druck und arterieller Blutdruck (A. femoralis) wurden auf einem Rußkymographion gleichzeitig mit je einem Hg-Manometer registriert.

Die Prüfung des pressoreceptorischen Funktionskreises erfolgte in zeitlichen Abständen von 5—10 min, indem der Druck im Sinuspräparat stufenweise (jeweils 20 mm Hg) über einen Druckbereich von 0—200 mm Hg erhöht wurde. Vorher wurden, um den Gefäßreflex möglichst rein darzustellen, beide Nn. vagi durchtrennt sowie während jeder Charakteristik die nicht präparierte Rezeptionszone, d. h. der durchblutete Sinus durch Abklemmung der A. carotis communis vorübergehend funktionell ausgeschaltet.

Zur i.v. Infusion der mit Aqua dest. verdünnten Megaphenlösung diente eine ventillose, durch Elektromotor betriebene Schlauchpumpe. In einzelnen Fällen erfolgte die Untersuchung der lokalen Wirkung von Megaphenlösungen durch Einfüllen in den präparierten Carotisblindsack bzw. Auftupfen auf die Sinusbifurkation.

Als *regulierter Blutdruck* wird nach Palme im folgenden die Blutdruckhöhe bezeichnet, die in den Pausen zwischen den Charakteristiken vom letzten regulierenden Sinusnerven der nicht präparierten Seite eingestellt wird. Unter dem *Maximalblutdruck* ist jener Wert zu verstehen, auf den sich der Blutdruck nach Ausschaltung des letzten pressoreceptorischen Nerven, bei den vorliegenden Untersuchungen also nach Abklemmung der durchbluteten Carotis communis einstellt. Dieser Blutdruckwert ist bei *gegebenem* Herzminutenvolumen ein Anhalt für die *Erregungsgröße* des enthemmten Vasomotorenzentrums. Der *Minimalblutdruck* wird während maximaler reflektorischer Hemmung des Vasomotorenzentrums (Druck im Sinuspräparat = 200 mm Hg) eingestellt.

Ergebnisse

An den Kurven des in Abb. 1 dargestellten Versuches imponiert als auffälligste Veränderung der steile Maximalblutdruckabfall unmittelbar nach Beginn der Megapheninfusion. Eine Senkung so beträchtlichen Ausmaßes kann man am narkotisierten Hund bereits nach Infusion sehr kleiner

Megaphenmengen finden. So ist auch im abgebildeten Versuch der Effekt während der ersten Infusion (0,03 mg/kg/min) schon nach Infusion von nur 0,08 mg/kg Megaphen voll ausgeprägt. Der *Minimalblutdruck* zeigt dagegen keine typischen Veränderungen, sondern nur hin und wieder bei höherer Dosierung eine geringfügige Senkung. Anders verhält sich der *regulierte Blutdruck*. Wenn er vor Infusionsbeginn etwas höher oder tiefer

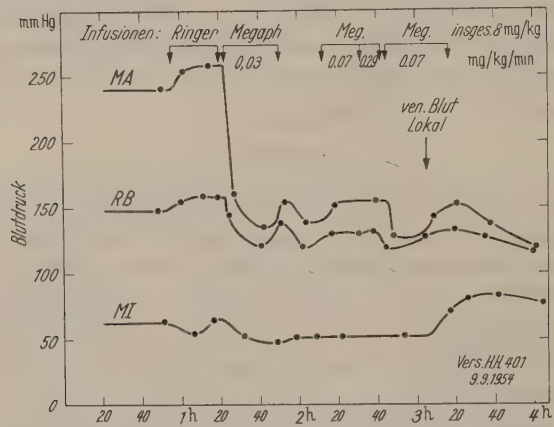


Abb. 1. *Megapheninfusionen in verschieden hohen Dosierungen.* Zu Versuchsbeginn Infusion von Ringer-Lösung, unmittelbar nach Beginn der ersten Megapheninfusion starke Senkung des enthemmten Blutdruckes (*Ma*). Gegen Versuchsende Prüfung der lokalen Wirksamkeit des im Blut zirkulierenden Megaphens durch Einfüllen von Venenblut des Versuchstieres in das Sinuspräparat. — *Ma* Maximalblutdruck; *RB* regulierter Blutdruck; *Mi* Minimalblutdruck. — Megaphen: 1. Infusion 0,03 mg/kg/min. 2. Infusion 0,07 mg/kg/min erhöht auf 0,29 mg/kg/min. 3. Infusion 0,07 mg/kg/min. Infundierte Gesamtmenge 8 mg/kg. — Meßpunkte von 14 Blutdruckcharakteristiken. Beide Vagi durchschnitten. Sinuspräparat rechts. Linke A. carotis während jeder Blutdruckcharakteristik abgeklemmt. Spontanatmung. Grundnarkose: Morphin. (0,01 g/kg)-Urethan (0,30 g/kg). Hund 401 vom 9. 9. 1954

als 120 mm Hg lag, strebte er bald nach Beginn der Megapheninfusion stets durch Senkung oder Anstieg dem Druckbereich von 120 mm Hg zu, um diese Höhe im weiteren Versuchsverlauf trotz fortdauernder Infusion unverändert beizubehalten. Sofern aber seine Höhe bereits vor Infusionsbeginn im Druckbereich von etwa 120 mm Hg lag, blieb er unverändert, ungeachtet der infundierten Gesamtmenge Megaphen. In einem Fall blieb er sogar nach Infusion von insgesamt 22 mg/kg Megaphen unverändert, obwohl das Tier unter der Wirkung dieser höheren Dosis Muskelzuckungen und anfallsweise auftretende, koordinierte Laufbewegungen zeigte.

Es muß aber betont werden, daß das gleichförmige Verhalten des regulierten Blutdruckes nur dann beobachtet wurde, wenn man Megaphen nicht zu rasch infundierte. Nach i.v. *Stoß*injektion auch von nur niedrigen Megaphendosen treten zwar kurzfristige, aber beträchtliche Senkungen des regulierten Blutdruckes auf Als Beispiel hierfür sei auf Abb. 1 und 3 der Arbeit von Gadermann u. Donat verwiesen. Fast unmittelbar nach Beendigung jeder einzelnen, in Anbetracht der

Dosis, immer noch zu schnell erfolgenden i.v. Megapheninjektion strebt der Blutdruck rasch wieder auf ein Niveau von etwa 100—120 mm Hg zu [vom Autor allerdings als gegenregulatorischer (?) Anstieg bezeichnet]. Wenn man von diesen durch langsamere Injektion vermeidbaren Senkungen absieht, findet man bei GADERMANN u. DONAT unseren Beobachtungen entsprechend eine Blutdrucksenkung vom erhöhten Ausgangsniveau (160 mm Hg) bis auf etwa 120 mm Hg. Diese Höhe wird dann über einen sehr breiten Dosierungsbereich praktisch unverändert beibehalten.

Zur Prüfung der lokalen Megaphenwirkung an der pressoreceptorischen Rezeptionszone[1] wurden dem Versuchstier nach Infusion von insgesamt 8 mg/kg Megaphen einige Kubikzentimeter venösen Blutes entnommen, der Gerinnungseintritt durch Zugabe weniger Tropfen Liquemin[2] gehemmt und das Sinuspräparat mit dem entnommenen Blut gefüllt, nachdem vorher die im Präparat enthaltene Ringer-Lösung vorsichtig entfernt worden war (Abb. 1). Die örtliche Wirksamkeit der zur Zeit der Entnahme im venösen Blut vorhandenen Megaphenkonzentration ließ sich am Reflexerfolg während adäquater Reizung der Reflexone beurteilen. Der Anstieg des Minimalblutdruckes, d. h. die Verkleinerung des Reflexerfolges bei maximaler Reizung unmittelbar nach der Füllung des Präparates zeigt, daß Megaphen die Rezeptionszone in der vorliegenden Blutkonzentration lediglich anlähmt, keinesfalls aber zu einer kompletten Lähmung, d. h. vollständigen Funktionsuntüchtigkeit der Pressoreceptoren führt.

Im Diagramm der Abb. 2 ist von einem weiteren Versuch die Höhe des endosinualen Druckes gegen die jeweils reflektorisch eingestellte Blutdruckhöhe aufgetragen (Blutdruckcharakteristik). Es resultiert der bekannte S-förmige Verlauf. Während und auch nach Beendigung der Megapheninfusion fällt an den Charakteristiken außer dem schon von der Abb. 1 bekannten Absinken des Maximalblutdruckes besonders die deutliche Erhöhung der pressoreceptorischen Reizschwelle auf. Während die Reizschwelle anfänglich bei einem endosinualen Druck von etwa 60 mm Hg überschritten ist, wird sie nach Beginn der Infusion (meist schon nach 0,05—0,1 mg/kg Megaphen i.v.) um 20—30 mm Hg erhöht gefunden. Sie wird also erst beim endosinualen Druck von 80—100 mm Hg überschritten und bleibt auch nach dem Absetzen der Infusion über mehrere Stunden erhöht. Diese Reizschwellenerhöhung kann nicht etwa auf einen lokalen Angriff des Megaphens an der Receptionszone bezogen werden; denn der Carotissinus wurde ja bei der Präparation zirkulatorisch ausgeschaltet und war somit dem Angriff des i.v. infundierten Megaphens entzogen. Man muß zwar bedenken, daß nach Auftupfen bzw. Einfüllen von Megaphenlösung in das Sinuspräparat die Reizschwelle ebenfalls erhöht werden kann; aber bei dieser durch Lähmung

[1] Erstmalig mitgeteilt auf der PAWLOW-Tagung in Leipzig (Januar 1954).

[2] Für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen danken wir der Fa. Deutsche Hoffmann-La Roche.

der Pressoreceptoren verursachten Schwellenerhöhung steigt stets der Minimalblutdruck an (siehe Charakteristik 4 in Abb. 2). Die Reizschwellenerhöhung nach lokalem Angriff an der pressoreceptorischen Reflexzone läßt sich also am Anstieg des Minimalblutdruckes eindeutig von der während i.v. Megapheninfusion beobachteten unterscheiden.

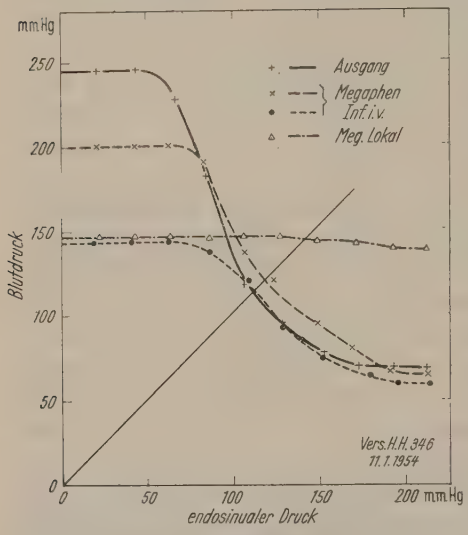


Abb. 2. *Senkung des Maximalblutdruckes bei gleichzeitiger Erhöhung der pressoreceptorischen Reizschwelle während und nach i.v. Megapheninfusionen.* Keine wesentliche Änderung der Regulationspunkte (Schnittpunkte mit 45°iger Geraden) bzw. des regulierten Blutdruckes. Praktisch völlige Aufhebung der Reflexbreite nach örtlicher Applikation von Megaphenlösung am Sinuspräparat (Lähmung der Receptionszone). — Blutdruckcharakteristiken in Absolutwerten. Megaphendosierungen: 0,06 mg/kg, 2,7 mg/kg i.v. Örtlich in 0,06%iger Lösung endosinual. — Narkose: Morphin (0,01 g/kg)-Urethan (0,31 g/kg). Hund Nr. 346 vom 11. 1. 1954

Für das Verhalten des *Minimalblutdruckes* während i.v. Megapheninfusion in Abb. 2 gilt das gleiche wie in Abb. 1. Er zeigt außer einer geringfügigen Senkung keine typischen Veränderungen.

Interessant ist das Verhalten des Regulationspunktes (Vogel)[1]. Er ändert seine eingestellte Höhe analog dem bei Abb. 1 besprochenen Verhalten des regulierten Blutdruckes nicht, da zugleich mit der Senkung des Maximalblutdruckes die pressoreceptorische Reizschwelle erhöht wird. Die Erhöhung der pressoreceptorischen Reizschwelle wird bei Dosen, die über etwa 0,08 mg/kg Megaphen liegen, bereits im vollen Umfang beobachtet und zeigt auch nach Verabreichung sehr hoher Megaphendosen keine weitere Erhöhung. Dagegen steht die Beeinflußbarkeit der Maximalblutdruckhöhe durch Megaphen in Abhängigkeit von der Ausgangshöhe; denn der Maximalblutdruck pflegt während i.v. Megapheninfusion von hohen Ausgangswerten stärker abzusinken, als von niedrigeren Ausgangswerten. Diese unterschiedliche Beeinflußbarkeit des Maximalblutdruckes einerseits sowie andererseits die gleichmäßige,

[1] Unter dem *Regulationspunkt*, der im abgebildeten Diagramm (Abb. 2) an jeder einzelnen Blutdruckcharakteristik als Schnittpunkt mit einer 45°igen Geraden abgelesen werden kann, ist nach Vogel jener Wert zu verstehen, auf den der Blutdruck reflektorisch gesenkt werden muß, um mit dem aufgewandten endosinualen Druck übereinzustimmen. Der Regulationspunkt gibt die Blutdruckhöhe an, auf die sich der Blutdruck einstellen müßte, wenn die isolierte Receptionszone (das Sinuspräparat) blutdruckregulierend wirksam wäre.

dosis-unabhängige Beeinflussung der pressoreceptorischen, zentralen Reizschwelle durch Megaphen trägt wesentlich zum unterschiedlichen Verhalten des regulierten Blutdruckes bei hoher bzw. bei niedriger Ausgangslage des Maximalblutdruckes bei. Bei hoher Ausgangslage steht quantitativ gesehen die stärkere Maximalblutdrucksenkung im Vordergrund — man sieht eine Senkung des regulierten Blutdruckes durch Megaphen bis auf etwa 120 mm Hg (Abb. 1). Dagegen liegt bei niedriger Ausgangslage des Maximaldruckes das Schwergewicht auf der Schwellenerhöhung der Pressoreceptoren — es muß im Rahmen der noch vorhandenen Reflexbreite der bereits eingangs diskutierte Anstieg des regulierten Blutdruckes resultieren.

Nicht ohne weiteres erklärbar bleibt, daß der Maximalblutdruck, sofern Megaphen nicht sehr schnell infundiert wird, in einem breiten Dosierungsbereich nicht wesentlich unter 100—120 mm Hg abzusinken pflegt, sondern diese Höhe auch nach Verabreichung höherer Megaphendosen nicht unterschreitet, obwohl Megaphen keinesfalls rasch aus dem Körper ausgeschieden wird.

Zur Frage einer eventuellen Blockade vasomotorischer Ganglien durch Megaphen sei darauf verwiesen, daß weder die nervös-reflektorisch vermittelten Blutdrucksenkungen noch der reflektorische Blutdruckanstieg nach Abklemmung der A. carotis communis selbst nach Infusion höherer Megaphendosen (von uns bis zu 22 mg/kg geprüft) aufgehoben waren. Lediglich eine gewisse Verlangsamung der reflektorischen Blutdruckänderungen, wie man sie auch vom Äther, Chloroform, Eunarcon und Evipan (Kalkoff) kennt, wurde beobachtet, wenn die infundierte Gesamtmenge Megaphen etwa 3—4 mg/kg überschritten hatte. Eine regelrechte Blockade der efferenten vasomotorischen Bahn ließ sich bis zu Gesamtdosen von 22 mg/kg Megaphen jedenfalls nicht nachweisen.

Diskussion

Der für die Blutdruckregulation wesentliche Angriffspunkt des Megaphens ist nach den vorliegenden Untersuchungen zentralen Ursprungs. Bereits bei Dosen von 0,05—0,09 mg/kg[1] wird die starke Senkung des Maximalblutdruckes in Verbindung mit der Erhöhung der zentralen, pressoreceptorischen Reizschwelle voll ausgeprägt beobachtet — beides Kriterien eines zentralen Angriffs.

Dagegen liegt die Schwellendosis für periphere Angriffspunkte nach eigenen Beobachtungen und Angaben des Schrifttums (Decourt, Brunaud u. Brunaud; Courvoisier u. Mitarb.; Jourdan, Duchêne-Marullaz u. Boissier) 10—100fach höher. Auch die von Bubnoff, Hoffmann, Schmid u. Taugner an Katzen bei inadäquater Reizung des

[1] Bemerkenswert ist die genaue Übereinstimmung mit den von Krause und Schmidtke-Runau angegebenen zentralen Schwellendosen.

Nierenplexus gefundenen niedrigsten peripheren Schwellendosen liegen mit 0,25 mg/kg immer noch 3—4fach höher als die von uns festgestellte zentrale Schwellendosis.

Ähnliche Verhältnisse treffen offensichtlich für die pressoreceptorische Reflexzone zu; die Lähmung der Reflexzone ist sogar nach Infusion von zentral weit überschwelligen Dosen, wie Abb. 1 zeigt, immer noch sehr geringfügig. Gegenteilige Angaben der Literatur sind unseres Erachtens darauf zurückzuführen, daß in den betreffenden Experimenten Megaphen unmittelbar in die A. carotis gespritzt wurde und dann, wie von uns nachgewiesen wurde, infolge seiner verhältnismäßig hohen örtlichen Konzentration zur Lähmung der Pressoreceptoren führte. Diese, unter extremen Bedingungen erhobenen Befunde dürfen selbstverständlich für Fragen der Blutdruckregulation nicht überbewertet werden (Witzleb u. Budde).

Daß dem bei höherer Dosierung hinzutretenden adrenolytischen Effekt des Megaphens bei der Einstellung des regulierten Blutdruckes wenig Bedeutung beizumessen ist, läßt sich den recht unwesentlichen Änderungen des Minimalblutdruckes, also dem Verhalten jenes Blutdruckwertes entnehmen, bei dessen Einstellung während einer Blutdruckcharakteristik die Gefäßperipherie zentralnervösen Einflüssen kurzfristig entzogen wird. Dementsprechend fanden auch Jourdan u. Mitarb. an rückenmarklosen Hunden keine nennenswerte Blutdruckbeeinflussung durch Präparat 4560 R.P. Die negative Interpretation dieser am Minimalblutdruck erhobenen Beobachtung ist besonders deshalb begründet, weil man im Gegensatz zum Megaphen während i.v. Infusion von typisch peripher angreifenden Stoffen, z. B. von Histamin (Barner-Brückner u. Hattwich) die quantitativ wesentlichste Veränderung im Sinne einer Senkung erheblichen Ausmaßes gerade am Minimalblutdruck — also während vorübergehender, funktioneller Entnervung der Gefäßperipherie — findet. Weiterhin zeigen Untersuchungen der Druck- Stromvolumenbeziehung (I-P-Beziehung, Wezler u. Sinn sowie Barner-Brückner), die vereinzelt zur Orientierung vorgenommen wurden, daß die Vasoaktivität eines peripheren Gefäßgebietes (Hinterextremität) während Megapheninfusion lediglich der Maximalblutdruckänderung folgend eingeschränkt, aber niemals wesentlich verändert oder etwa aufgehoben wurde.

Der adrenolytische Effekt dürfte also ebenso wie unvollständige Lähmung der pressoreceptorischen Reflexzonen die Höhe des regulierten Blutdruckes kaum beeinflussen. Denn schon allein wegen der weit niedrigeren zentralen Schwellendosis des Megaphens muß einer jeglichen peripher bedingten Zustandsänderung im Funktionskreis die *zentrale Verstellung* (Maximalblutdrucksenkung und pressoreceptorische Reizschwellenerhöhung) vorangehen. Unter diesen Voraussetzungen kann eine eventuell doch peripher bedingte Vasodilation für die Blutdruckeinstellung quantitativ nicht mehr sehr stark ins Gewicht fallen. Durch diese, die Blutdruckregulation betreffenden Tatsachen, wird aber keineswegs die therapeutische Bedeutung der adrenolytischen Wirkung des Megaphens, z. B. beim Spannungskollaps, geschmälert.

Für das regulative Zusammenspiel aller Teilstrecken des pressoreceptorischen Funktionskreises, d. h. für die Einstellung des regulierten Blutdruckes werden, wie die Befunde überzeugend zeigen, während der Megapheninfusion besonders günstige Voraussetzungen geschaffen, da

zwar einerseits die zentralen konstriktorischen Impulse vermindert werden (Maximalblutdrucksenkung), andererseits aber infolge der Reizschwellenerhöhung der zentral hemmende, blutdrucksenkende Einfluß der Pressoreceptoren bedeutend herabgesetzt wird. Durch diesen, nach unseren bisherigen Untersuchungen nur dem Megaphen eigentümlichen, die Blutdruckregulation funktionell gegensinnig beeinflussenden Angriff (zentrale Erregungssenkung der Vasomotoren mit gleichzeitiger zentraler Erregbarkeitssenkung für pressoreceptorische Reize) sind wesentliche Voraussetzungen für die in vielen Fällen verblüffende Konstanz des regulierten Blutdruckes während Megapheneinwirkung gegeben; denn die Reizschwellenerhöhung wirkt der Maximalblutdrucksenkung kompensatorisch entgegen. Es können aber bei hoher bzw. niedriger Ausgangslage des regulierten Blutdruckes, wie bereits diskutiert wurde, die quantitativen Beziehungen zwischen Maximalblutdrucksenkung und Reizschwellenerhöhung so verschoben werden, daß bei hoher Ausgangslage eine geringe Senkung und bei niedriger Ausgangslage ein mäßiger Anstieg des Blutdruckes resultiert. Klinische Beobachtungen von Sapir nach langsamer Injektion kleiner Megaphendosen bei Normotonikern, Hypotoniker und Hypertoniker sowie Untersuchungen von Aizawa u. Mitarb. weisen in die gleiche Richtung.

Ungeklärt bleibt die Beobachtung, daß Megaphen, auch in extrem hoher Dosierung langsam infundiert, im Gegensatz zu anderen zentral angreifenden Mitteln den *Maximalblutdruck* nicht wesentlich unter 120—100 mm Hg senkt.

Die Vermutung, daß Megaphen im Gegensatz zu vielen anderen Narcoticis relativ isoliert an zentralen Kerngebieten angreift und die Eigentätigkeit untergeordneter nervöser, vasomotorischer Strukturen wenig beeinflußt, kann zur Zeit nur hypothetischen Charakter haben. Die direkt gewonnenen Erkenntnisse sind unter anderem deshalb so gering, weil die Ableitung efferenter, eindeutig vasomotorisch identifizierbarer Aktionspotentiale rein versuchstechnisch auch heute immer noch problematisch ist.

Zusammenfassung

1. Die Blutdruckwirkung von i.v. Megapheninfusionen wurde an vagotomierten Hunden in Morphin-Urethan-Grundnarkose untersucht. Die Analyse der pressoreceptorischen Kreislaufreflexe erfolgte mit Hilfe von Blutdruckcharakteristiken.

2. Im Vordergrund der Wirkung steht mit sehr niedriger Schwellendosis (0,05—0,1 mg/kg) ein zentraler Angriff des Megaphens, wie die starke Senkung des enthemmten Blutdruckes (Senkung der zentralen Vasomotorenerregung) in Verbindung mit der andauernden Erhöhung der pressoreceptorischen Reizschwelle (Verminderung der zentralen Erregbarkeit für pressoreceptorische Reize) zeigen. Durch diese *andauernde*

Erhöhung der zentralen pressoreceptorischen Reizschwelle unterscheidet sich Megaphen von den gebräuchlichen Narcoticis.

3. Dieser 2fache zentrale Angriff des Megaphens beeinflußt die *Blutdruckregulation* gegensinnig. Er ist eine wesentliche Ursache für die Konstanz der regulierten Blutdruckhöhe, die selbst noch nach sehr hohen Dosen beobachtet werden konnte, wenn Megaphen nicht zu rasch infundiert wurde. Auch der mäßige Blutdruckabfall bei hoher und der mäßige Anstieg bei niedriger Ausgangslage des regulierten Blutdruckes während niedrig dosierter Megapheninfusion läßt sich an Hand der Blutdruckcharakteristiken auf quantitative Unterschiede dieses dem Megaphen eigentümlichen Angriffs zurückführen.

4. Periphere Angriffspunkte (adrenolytischer Effekt, Nebennierenblockade, Lähmung der Pressoreceptoren), deren Schwellendosen weit höher liegen, haben in quantitativer Hinsicht nur eine untergeordnete Bedeutung für Veränderungen der Blutdruckeinstellung.

5. Eine Blockierung der efferenten Vasomotoren durch Megaphen, ähnlich der bei TAB und Pendiomid kurzfristig beobachtbaren, läßt sich nicht nachweisen.

Literatur

Aizawa, T., Y. Goto, Tazaki, S. Hamaya and K. Makino: The Keio J. of Med. **5**, 205 (1956). — Barner-Brückner, G.: im Druck. — Barner-Brückner, G., u. H. R. Hattwich: im Druck. — Bartis, K., R. Knight, G. Boris, M. Dizon and J. Moyer: Med. Rec. Ann. (Hoursten) **48**, 758 (1954). — Budde, H., u. E. Witzleb: Dtsch. Ges. Inn. Med. **60**, 790 (1954). — Bubnoff, M. v., D. Hoffmann, E. Schmid u. R. Taugner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 443 (1955). — Brunaud, M., S. Brunaud et Ph. Decourt: C. r. Soc. Biol. (Paris) **147**, 1764 (1953. — Cathala, H. P., et J. J. Pocidalo: C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 1709 (1952). — Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — Duesberg, R., u. H. Spitzbarth: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **60**, 155 (1954). — Gadermann, E., u. K. Donat: Arch. internat. Pharmacodynamie **102**, 85 (1955). — Jourdan, F., P. Duchêne-Marullaz u. P. Boissier: Arch. internat. Pharmacodynamie **101**, 253 (1955). — Kalkoff, W.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **17**, 204 (1951). — Kalkoff, W., u. W. Blech: Z. exper. Med. **124**, 142 (1955). — Koch, Eb.: Die reflektorische Selbststeuerung des Kreislaufes. Dresden u. Leipzig: Steinkopff 1931. — Krause, D. u. D. Schmidtke-Ruhnau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 243 (1955). — Marx, H., u. G. Barner-Brückner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 415 (1953). — Maurice, G., Mathews, W. u. J. Mayer: Count Res. Anesth. a. Analg. (1954) S. 340. — Palme, F.: J. of Exper. Med. **9**, 404 (1951). — Palme, F., u. W. Kalkoff: C. r. Congr. int. d'Angiéol. (Fribourg) 1955, S. 60. — Palme, F., u. J. Vogel: im Druck. — Sapir M.: Erste Arbeitstagung über zentrale Regulation der Funktion des Organismus. Leipzig 1955, S. 253. — Vogel, J.: Inaug.-Diss. Halle 1953. — Wezler, K., u. W. Sinn: Das Strömungsgesetz des Blutkreislaufes. Aulendorf: Editio Cantor 1953. — Wiemers, K., u. E. Kaniak: Vortr. a. d. Tag. d. mittelrhein. Chirurgenvereins (1954) Basel. — Zürn, L.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **60**, 140 (1954).

Dr. W. Kalkoff, Halle/Wittenberg (Saale), Institut für experimentelle Pathologie der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 577—585 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Prof. W. Wilbrandt)

Vergleich der Wirkungen von Calcium und Digitalis auf die aktiven und passiven Kaliumbewegungen durch die Erythrocytenmembran*

Von
P. Lundsgaard-Hansen

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juni 1957)

In der Erforschung des Wirkungsmechanismus der Herzglykoside wurde seit mehreren Jahren dem Digitaliseffekt auf die Ionenverschiebungen durch die Zellmembran des Myokards lebhaftes Interesse zuteil. Bei der Interpretation sieht Szent-Györgyi und seine Schule[6,7,8,22] das Grundelement der Digitaliswirkung in der Hemmung des aktiven Einwärtstransportes von Kalium in der Erholungsphase des Kontraktionscyclus, wodurch die Entstehung einer Kaliumkonzentration im Zellinnern verhindert wird, welche das Optimum für die Actomyosinkontraktion übersteigt. Demgegenüber haben Wilbrandt u. Mitarb.[16,28,29,30,31] die Vorstellung entwickelt, daß der Transport von Calcium durch die Zellmembran den Angriffspunkt für die Herzglykosidwirkung bildet. Eine wichtige Stütze für diese Hypothese war die von Moulin u. Wilbrandt[16] nachgewiesene Unterdrückung der Bowditschschen Treppe am Froschherzen durch Calcium.

Vor kurzem hat nun Szent-Györgyi[23] die Vermutung ausgesprochen, die Calciumwirkung bestehe bloß darin, daß Calcium ebenso wie Digitalis die Akkumulation einer für die Actomyosinkontraktion ungünstigen Kaliumkonzentration im Zellinnern verhindere. Im Gegensatz dazu wies jedoch Witt[33] am ruhenden Froschsartorius nach, daß Calcium im Gegensatz zu Strophanthin den Kaliumaustritt in kaliumfreie Lösungen nicht beeinflußt. Reiter[18,19] fand am Herzmuskel junger Ratten mit Calcium in bezug auf die Verschiebungen von Kalium und Natrium ebenfalls keine digitalisähnliche Wirkung.

Nachdem Schatzmann[20] die Blockierung der Kationenpumpe der Erythrocytenmembran durch Digitaliskörper nachweisen und Joyce u.

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Sandoz-Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

Weatherall[13], Kahn u. Acheson[14,15] sowie Glynn[4,5] seine Ergebnisse bestätigen konnten, erschien der Erythrocyt als ein geeignetes Modell für die Prüfung der Stichhaltigkeit der von Szent-Györgyi vorgeschlagenen Deutung der Calciumwirkung auf die Herzmuskelkontraktion.

Durch die Membran der Muskelzelle finden zwei Arten von Kationenverschiebungen statt[3]. In der Erregungsphase ist die Membran depolarisiert, die entlang den Konzentrationsgradienten erfolgenden Ionenbewegungen sind passiv. In der Erholungsphase verlaufen sie durch die repolarisierte Membran gegen das Konzentrationsgefälle und haben den Charakter aktiver Transporte.

Zwei ähnliche Verschiebungen sind am Erythrocyten zu beobachten. Wie Harris[9] entdeckt hat, tritt bei Kaltlagerung von Erythrocyten im Eigenplasma ein Verlust von intracellulärem Kalium ein, an dessen Stelle Natrium in die Zelle eindringt (im folgenden als Harris Phase I bezeichnet). Bei Wiedererwärmung der Zellen und Zugabe von Glucose setzt ein aktiver Transport von Kalium nach innen und von Natrium nach außen ein (Harris Phase II). Zwischen der Phase I von Harris und den Erregungsverschiebungen am Muskel besteht insofern eine Parallele, als in beiden Fällen die stattfindenden Ionenverschiebungen passiv sind und dem Ausgleich der Konzentration beiderseits der Zellmembran zustreben. Die Phase II von Harris und die Erholungsverschiebungen durch die Muskelmembran beruhen beide auf der Tätigkeit eines aktiven Pumpmechanismus. Auch zu der erhöhten Kationenpermeabilität bei Depolarisation der Nerv- oder Muskelmembran besteht am Erythrocyten eine Parallele.

Jacobs[10] sowie Jacobs u. Parpart[11] konnten zeigen, daß Erythrocyten bei Inkubation in Saccharoselösung einen osmotischen Verlust erleiden. Nach Davson[2] liegt diesem Phänomen ein Verlust von intracellulärem Kalium zugrunde. Dieser Verlust erreicht in der reinen Nichtleiterlösung ein Maximum und wird durch Beimischung steigender Elektrolytmengen zur Außenlösung immer kleiner. Der Fragenkomplex der Ionenpermeabilität der Erythrocyten in Nichtleiterlösungen wurde von Wilbrandt[25] ausführlich behandelt. Neuerdings haben Wilbrandt u. Mitarb.[32] angenommen, daß das Suspendieren gewaschener Erythrocyten in einem Gemisch von isotonischer Salzlösung und isotonischer Saccharoselösung bei niedriger Konzentration des Elektrolyten eine Depolarisation der Erythrocytenmembran bewirkt, deren Ausmaß durch das Verhältnis $(Cl)_{innen}/(Cl)_{außen}$ gegeben ist. Da die Membran der Muskelzelle in der Erregungsphase ebenfalls depolarisiert ist, scheint der unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zu beobachtende Kaliumverlust der Erythrocyten für einen Vergleich besser geeignet als derjenige, der während der Phase I von Harris gemessen werden kann. Nach dem Gesagten ist bei Aufbewahrung der Erythrocyten im elektrolythaltigen Eigenplasma eine Depolarisation der Zellmembran nicht anzunehmen.

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage geprüft werden, ob die aktiven und passiven Kaliumverschiebungen in der Phase II von Harris, bzw. nach Depolarisation der Erythrocytenmembran von Calcium und Digitalis in gleicher Weise beeinflußt werden.

Methodik

Für sämtliche Versuche wurde durch Venenpunktion gewonnenes, mittels Rühren mit einem Holzstäbchen defibriniertes Menschenblut verwendet.

A. Prüfung der Wirkung von Calcium und Digitalis auf die Kationenpumpe (Harris Phase II)

Die Erythrocyten werden 3 Tage im Eigenplasma bei 4° C aufbewahrt. Diese Lagerungszeit ergibt nach Ponder[17] ein optimales Arbeiten der Pumpe nach Wiedererwärmung der Zellen. Als Kontrolle dienen Kälteerythrocyten im Eigenplasma. Die restlichen Zellen werden in 4 gleich große Portionen geteilt, vom Plasma abzentrifugiert und dreimal mit einer Lösung gewaschen, die 35 mM KCl + 125 mM NaCl (= 1,0 isotonisch) enthält. Mit diesen Salzkonzentrationen in der Außenlösung ist $(K)_{außen} < (K)_{innen}$ und $(Na)_{außen} > (Na)_{innen}$, so daß die Pumpe wie bei der Kontrolle gegen die Konzentrationsgradienten beider Ionen arbeiten muß. Nach erfolgtem Waschen wird die anfänglich entfernte Plasmamenge durch das gleiche Volumen folgender Lösungen ersetzt:

Tabelle 1

	I	II	III	IV
$CaCl_2$	0,0 mM	2,5 mM	5,0 mM	10,0 mM
KCl	35,0 mM	35,0 mM	35,0 mM	35,0 mM
NaCl	125,0 mM	122,5 mM	120,0 mM	115,0 mM

Die Kontrolle und die Reihen I und IV werden doppelt angesetzt, mit 10^{-5} Strophosid und ohne Glykosid. Sämtliche Portionen werden nach Zugabe von 200 mg-% Glucose in Substanz im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Bei Versuchsbeginn und nach $^1/_2$, 1, $1^1/_2$, 2 u. 3 Std werden Proben zu 0,5 ml entnommen. Die Zellen werden einmal mit 1,0 isotonischem Cholinchlorid gewaschen und anschließend mit 5,0 ml quarzdestilliertem Wasser hämolysiert. Die Messung von Kalium und Natrium erfolgt flammenphotometrisch im Hämolysat. Aus den erhaltenen Werten wird der Quotient $(K)_{innen}/(Na)_{innen}$ (mÄq./L Suspension) gebildet und der Quotient bei Versuchsbeginn gleich 100% gesetzt. Die aus den späteren Messungen berechneten Quotienten werden als Prozent dieses Nullwertes ausgedrückt. Diese Auswertung der Meßresultate gewährleistet die Ausschaltung jener Versuchsfehler, die durch kleine Volumenunterschiede zwischen den einzelnen Proben (Hämolyse, kleine Verluste von Zellen beim Waschen) entstehen können. Die Ergebnisse werden gegen die Zeit aufgetragen.

B. Prüfung der Wirkung von Calcium und Digitalis auf den Kaliumaustritt durch die depolarisierte Erythrocytenmembran

In diesen Versuchen wurden Gemische aus isotonischen Lösungen von Saccharose (10,2%), Natriumchlorid (0,16 molar) und Calciumchlorid (0,13 molar) verwendet. Im folgenden ist der Gehalt an Totalelektrolyt wie an den einzelnen Elektrolyten jeweils in Prozent angegeben, wobei der prozentuale Anteil der isotonischen Elektrolytlösung am Gemisch zu verstehen ist („3% NaCl" also 3% isotonisch NaCl + 97% isotonisch Saccharose). Die vom Plasma durch Zentrifugieren abgetrennten Erythrocyten werden dreimal mit 10% NaCl in Saccharose gewaschen. Orientierende Versuche zeigten, daß beim Arbeiten mit dieser Elektrolytkonzentration während der zum Waschen benötigten Zeit kein Verlust von intracellulärem

Kalium stattfindet. Man erreicht aber eine ausreichende Reduktion des Elektrolytgehaltes der intercellulären Flüssigkeit, der sonst die Genauigkeit des Versuches beeinträchtigt. Die in dieser Weise vorbehandelten Zellen wurden für 2 Versuchsreihen verwendet.

1. Flammenphotometrische Messung des ausgetretenen Kaliums. 0,2 ml gewaschene Zellen wird in 10,0 ml folgender Lösungen suspendiert (Tab. 2).

Nach 3, 9, 18, 27 u. 40 min wird eine Probe zu 1,0 ml jeder Suspension entnommen und mit 4,0 ml isotonischem Natriumphosphatpuffer (p_H 7,3) vermischt. Wie Davson[2] zeigen konnte, wird durch nachträglichen Zusatz von Elektrolyt der bereits begonnene Salzaustritt sofort zum Stehen gebracht. Die Zellen werden durch Zentrifugieren abgetrennt und das ausgetretene Kalium unter Abzug eines Blindwertes flammenphotometrisch gemessen. Die Ergebnisse werden in mMol/L Suspension ausgedrückt und gegen die Zeit aufgetragen.

Tabelle 2

Totalelektrolyt	NaCl %	$CaCl_2$ %
3%	3,0	0,0
	2,7	0,3
	2,4	0,6
	1,8	1,2
1,8%	1,8	0,0
	1,5	0,3
	1,2	0,6
	0,6	1,2

2. Osmotische Messung der Volumenabnahme der Erythrocyten. Die von Wilbrandt ausgearbeitete und mehrfach beschriebene osmotische Methodik[24,26,27] wurde benützt. Das Prinzip des Verfahrens besteht in der Bestimmung des osmotisch aktiven Zellinhaltes durch wiederholte Aufnahme osmotischer Resistenzkurven mittels photoelektrischer Messung der Lichtdurchlässigkeit der Suspension. Aus den Verschiebungen der Resistenzkurven können die Änderungen des osmotisch aktiven Inhaltes und damit des Zellvolumens ermittelt werden. Für Einzelheiten wird auf die zitierten Veröffentlichungen hingewiesen.

0,5 ml gewaschene Zellen wird in 10,0 ml der Lösungen suspendiert, deren Zusammensetzung nachstehend angegeben ist:

Tabelle 3

Totalelektrolyt	NaCl %	$CaCl_2$ %	Strophosid-konzentration
3%	3,0	0,0	0
	3,0	0,0	10^{-5}
	2,7	0,3	0
	2,7	0,3	10^{-5}
1,8%	1,8	0,0	0
	1,8	0,0	10^{-5}
	1,5	0,3	0
	1,5	0,3	10^{-5}

Nach 3, 9, 18, 27 u. 40 min Inkubation bei 37° C wird mit 0,2 ml Suspension pro 5,0 ml Natriumphosphatpuffer 1,0—0,1 isotonisch die osmotische Resistenz der Zellen bei Zimmertemperatur bestimmt und daraus die Volumenänderung berechnet, wobei das Anfangsvolumen gleich 1,0 gesetzt wird. Die Resultate werden gegen die Zeit aufgetragen.

Resultate

Abb. 1 zeigt die Beeinflussung der Kationenpumpe durch Calcium und Digitalis. Eine Wirkung von Calcium in Konzentrationen von 0 bis zu 10 mM ist weder in den strophosidfreien noch in den 10^{-5} Glykosid enthaltenden Lösungen nachweisbar. Die Meßpunkte bei verschiedenen Calciumkonzentrationen zeigen keine Unterschiede, die außerhalb der

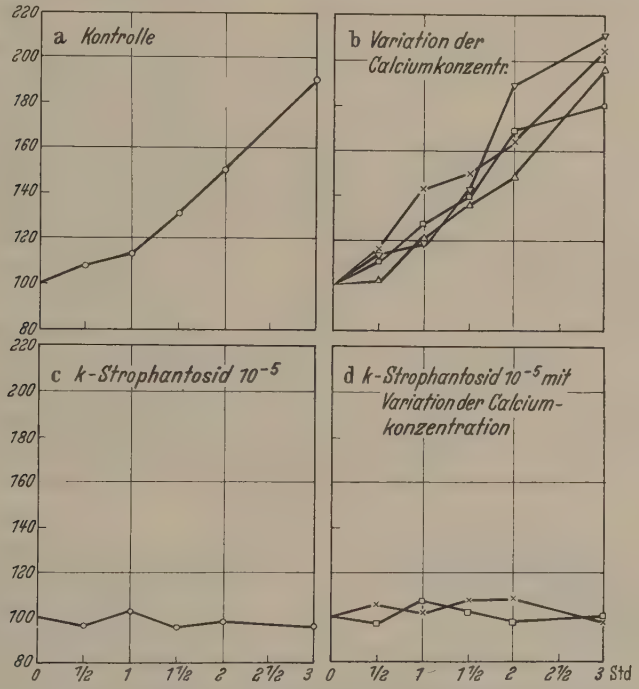


Abb. 1. Beeinflussung der Kationenpumpe der Erythrocyten durch Calcium und Digitalis (HARRIS Phase II). Abszisse: Versuchsdauer in Stunden; Ordinate: $(K)_{innen}/(Na)_{innen}$ in Prozent des Wertes bei Versuchsbeginn. — a Erythrocyten in Plasma (Kontrolle). b Erythrocyten in Salzlösungen mit variierter Calciumkonzentration: × 0,0 mM Ca, △ 2,5 mM Ca, ▽ 5,0 mM Ca, □ 10,0 mM Ca c Erythrocyten in Plasma mit Strophosid 10^{-5}. d Erythrocyten in Salzlösungen mit Strophosid 10^{-5}: × 0,0 mM Ca, □ 10,0 mM Ca

Streubreite liegen würden. Die am Erythrocyten zuerst[20] nachgewiesene, dann aber von HAJDU[6] sowohl als von REITER[18,19] auch am Herzmuskel bestätigte hemmende Wirkung der Digitaliskörper auf den aktiven Transport von Natrium und Kalium findet demnach in der Calciumwirkung keine Parallele.

Abb. 2 u. 3 stellen die Wirkung von Calcium und Digitalis auf den Kaliumaustritt durch die depolarisierte Membran bei Totalelektrolytkonzentrationen von 3,0 bzw. 1,8% dar. Abb. 2 gibt die flammenphotometrisch gemessenen Werte wieder. Eine deutliche Hemmwirkung von

Calcium auf den Kaliumaustritt ist ersichtlich, die mit 1,2% Calcium nach 40 min größenordnungsmäßig 50% beträgt. Die in Abb. 3 zusammengefaßten Ergebnisse wurden mit der osmotischen Methodik erhalten. Hier hat nun Strophosid in der die Pumpe vollständig blockierenden Konzentration von 10^{-5} bei den angewandten Totalelektrolytkonzentrationen und bei Calciumkonzentrationen von 0,0 bzw. 0,3% keinen Einfluß auf den Kaliumaustritt. Die Unterschiede zwischen den Meßpunkten übersteigen auch in diesem Falle nirgends die Streubreite. Es besteht also auch hier eine Diskrepanz zwischen der Calcium- und der Digitaliswirkung.

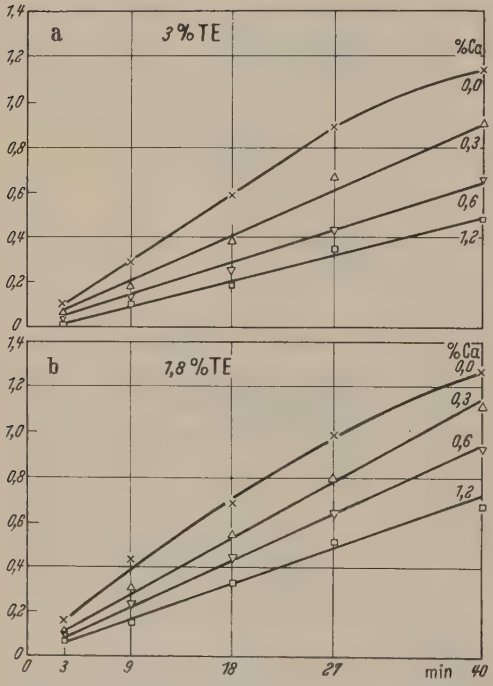


Abb. 2. Einfluß der Calciumkonzentration auf den Kaliumaustritt, flammenphotometrische Messung. Abszisse: Versuchsdauer in Minuten; Ordinate: ausgetretenes Kalium in mMol/L Suspension. — a 3% Totalelektrolyt (TE). b 1,8% Totalelektrolyt (TE). Calciumkonzentrationen: × 0,0%, △ 0,3%, ▽ 0,6%, □ 1,2%

Aus den Abb. 2 u. 3 ist ersichtlich, daß die chemische und die osmotische Methode zur Verfolgung des Kaliumaustrittes durch die depolarisierte Membran gleiche Resulte ergeben haben.

Diskussion

Die von Szent-Györgyi[23] vermutete Parallele zwischen den Wirkungen von Calcium und Digitalis auf die Kaliumverschiebungen konnte am Erythrocyten weder für die aktiven noch für die passiven Ionenbewegungen nachgewiesen werden. Calcium beeinflußte in unseren Versuchen die passive, nicht aber die aktive Kaliumverschiebung, währenddem sich Strophosid gerade umgekehrt verhielt.

Es stellt sich die Frage, inwieweit eine Parallelisierung der Erythrocytenversuche und der Digitaliswirkung am Herzmuskel berechtigt ist. Erythrocyt und Myokard weisen wohl in bezug auf Struktur und Funktion erhebliche Unterschiede auf, die sich möglicherweise auch auf die Eigenschaften der Zellmembran erstrecken, andererseits sind wenigstens im Falle der Digitaliswirkung einige Ähnlichkeiten bereits bekannt.

Die Blockierung der Kationenpumpe des Erythrocyten ist noch bei sehr hoher Verdünnung des Glykosids nachweisbar. Sulser[21] hat unter günstigen Bedingungen (längere Kaltlagerung der Zellen) eine Schwellenkonzentration von 10^{-10} ermittelt. Nach Cattell u. Gold[1] reagiert der Papillarmuskel — das bisher empfindlichste Objekt — auf Herzglykosid noch in einer Konzentration von 10^{-9}, was mit der therapeutisch zur Anwendung kommenden Konzentration etwa gleichgesetzt wird. Am Froschherzen ist eine Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} notwendig. Die Schwellenkonzentrationen am Erythrocyten und am Herzmuskel sind also vergleichbar.

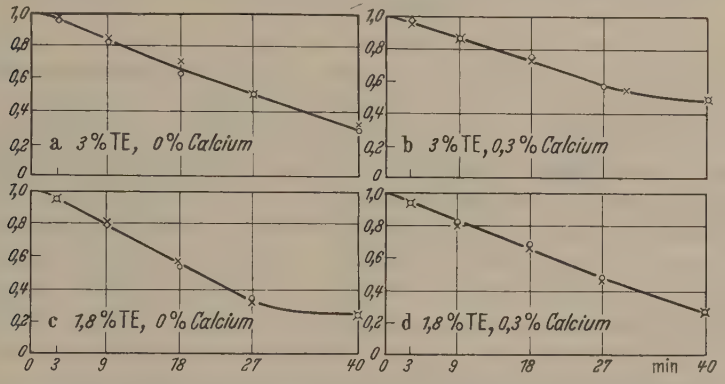


Abb. 3. Einfluß von Calcium und Digitalis auf den Kaliumaustritt, osmotische Messung. Abszisse: Versuchsdauer in Minuten; Ordinate: Zellvolumen im Verhältnis zum Ausgangsvolumen 1,0. a 3% Totalelektrolyt (TE), 0,0% Calcium. b 3,0% Totalelektrolyt (TE), 0,3% Calcium. c 1,8% Totalelektrolyt (TE), 0,0% Calcium. d 1,8% Totalelektrolyt (TE), 0,3% Calcium. ○ kein Strophosid, × 10^{-5} Strophosid

Für die Zulässigkeit eines Vergleiches der Digitaliswirkung am Herzen und am Erythrocyten spricht ferner, daß in beiden Fällen nur diejenigen Glykoside wirksam sind, deren Molekül einen Lactonring enthält. Die Parallele zu dieser am Herzen erstmals von Jacobs u. Hoffmann[12] nachgewiesenen Abhängigkeit der Glykosidwirkung von einer bestimmten chemischen Struktur haben am Erythrocyten zuerst Kahn u. Acheson[14,15] festgestellt. Sie fanden zudem — wenn auch erst bei höheren Konzentrationen — eine Hemmwirkung auf die Kationenpumpe durch einige einfache Lactone, die sonst mit Digitalisglykosiden nichts gemeinsam haben. Dafür hatten mehrere positiv inotrop wirksame Substanzen anderer chemischer Konstitution (Veratrumalkaloide, Adrenalin, Tetraäthylammonium) auf die Kationenpumpe keinerlei Einfluß. Eine ähnliche Abhängigkeit der Glykosidwirkung am Erythrocyten von der Struktur des Moleküls hat vor kurzem Glynn[5] gefunden.

Die Prüfung der von Wilbrandt u. Mitarb.[16,28,29,30,31] angenommenen Wirkung von Digitalis auf den Calciumtransport durch die Zellmembran war am Erythrocyten deshalb vorläufig nicht durchführbar, weil er im Zellinnern kein Calcium enthält und es sich bisher als unmöglich erwies, Calcium unter Erhaltung der Pumpaktivität in die Zelle einzuführen.

Im Zentrum des therapeutischen Interesses der Digitalisglykoside steht ihre Wirkung auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels, die von Calcium ebenfalls gefördert wird. Ob sich der positiv inotrope

Digitaliseffekt über einen Transportmechanismus für Calcium oder über denjenigen für Natrium und Kalium abspielt, läßt sich heute noch nicht entscheiden. Mit den Ergebnissen von Witt[33] und Reiter[18,19] übereinstimmend sprechen aber unsere Resultate auf jeden Fall dafür, daß den Wirkungen von Calcium und von Digitalis auf die Herzmuskelkontraktion nicht der gleiche Mechanismus an der Zellmembran zugrunde liegt.

Zusammenfassung

Die Wirkungen von Calcium und Digitalis auf die aktiven und passiven Kaliumverschiebungen durch die Erythrocytenmembran wurden verglichen.

Die Beeinflussung der Kalium-Natriumpumpe wurde mit der von Harris angegebenen Methodik untersucht. Die passiven Kaliumverschiebungen wurden nach Depolarisation der Zellmembran mittels Inkubation der Zellen in Gemischen von isotonischer Salzlösung und isotonischer Saccharoselösung bei niedriger Elektrolytkonzentration verfolgt.

Die Kalium-Natriumpumpe wurde von *Digitalis* blockiert, von *Calcium* nicht beeinflußt. Die passiven Kaliumverschiebungen wurden von Calcium gehemmt, wogegen Herzglykosid ohne Wirkung war.

Die Bedeutung der Befunde für die Interpretation des Wirkungsmechanismus der Herzglykoside wird diskutiert.

Literatur

[1] Cattell, McK., and H. Gold: J. of Pharmacol. **62**, 116 (1938). — [2] Davson, H.: Biochemic. J. **33**, 389 (1939). — [3] Fleckenstein, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch als Energieprinzip in Muskel und Nerv. Berlin: Springer 1955. — [4] Glynn, I. M.: J. of Physiol. **128**, 56P (1955). — [5] Glynn, I. M.: J. of Physiol. **136**, 148 (1957). — [6] Hajdu, S.: Amer. J. Physiol. **174**, 371 (1953). — [7] Hajdu, S., and A. Szent-Györgyi: Amer. J. Physiol. **168**, 159 (1952). — [8] Hajdu, S., and A. Szent-Györgyi: Amer J. Physiol. **168**, 171 (1952). — [9] Harris, J. E.: J. of Biol. Chem. **141**, 579 (1941). — [10] Jacobs, M. H.: Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Wood's Hole **62**, 178 (1932). — [11] Jacobs, M. H., and A. K. Parpart: Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Wood's Hole **65**, 512 (1933). — [12] Jacobs, W. A., and A. Hoffmann: J. of Biol. Chem. **74**, 787 (1927). — [13] Joyce, C. R. B., and M. Weatherall: J. of Physiol. **127**, 33P (1955). — [14] Kahn, J. B. jr., and G. H. Acheson: Federat. Proc. **14**, 356 (1955). — [15] Kahn, J. B. jr., and G. H. Acheson: J. of Pharmacol. **115**, 305 (1955). — [16] Moulin, M., u. W. Wilbrandt: Experientia (Basel) **11**, 72 (1955). — [17] Ponder, E.: J. Gen. Physiol. **33**, 745 (1950). — [18] Reiter, M.: Ber. XX. Internat. Physiol. Kongreß, Brüssel 1956. — [19] Reiter, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 300 (1956). — [20] Schatzmann, H.-J.: Helvet. physiol. Acta **11**, 346 (1953). — [21] Sulser, F.: Unveröffentl. Versuche. Die Meßresultate sind wiedergegeben in: W. Wilbrandt, Dtsch. med. Wschr. **1957**, 1153. — [22] Szent-Györgyi, A.: Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle. New York: Academic Press Inc. 1953. — [23] Szent-Györgyi, A.: General Views on the Chemistry of Muscle Contraction. Adv. Cardiol., **1**, 6—51. Basel/New York: S. Karger 1956. — [24] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **241**, 289 (1938). —

[25] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **243**, 537 (1940). — [26] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **250**, 569 (1948). — [27] Wilbrandt, W.: Osmotische Erscheinungen und osmotische Methoden am Erythrocyten. Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handb. der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. II, 49—71. Berlin: Springer 1955. — [28] Wilbrandt, W.: Schweiz. med. Wschr. **1955**, 315. — [29] Wilbrandt, W., K. Brawand u. P. N. Witt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 397 (1953). — [30] Wilbrandt, W., u. R. Caviezel: Helvet. physiol. Acta **12**, C40 (1954). — [31] Wilbrandt, W., u. R. Caviezel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 203 (1954). — [32] Wilbrandt, W., H.-J. Schatzmann u. P. Lundsgaard-Hansen: In Vorbereitung. — [33] Witt, P. N.: of Pharmacol. **119**, 195 (1957).

Dr. P. Lundsgaard-Hansen,
Pharmakolog. Institut der Univ. Bern/Schweiz, Freiburgstr. 30

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 586—590 (1957)

Aus den pharmazeutisch-wissenschaftlichen Laboratorien
der Farbwerke Hoechst-AG

Antagonismus zwischen Adenosin und Methyl-Xanthinen am Reizleitungssystem des Herzens

Von
L. Ther, R. Muschaweck und J. Hergott

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 12. Juli 1957)

A. Frank u. Mitarb. haben vor kurzem tierexperimentell (Herzkatheterversuche am Hund) die Wechselbeziehungen von Oxyäthyltheophyllin und *Lacarnol*[1] untersucht und gefunden, daß der Wirkungsgrad der Herzarbeit unter Einfluß des Kombinationspräparates *Parmanil*[2] besser wird als bei alleiniger Gabe von Theophyllin- Derivaten. Diese Versuchsergebnisse sowie klinische Beobachtungen bei der gemeinsamen Verabfolgung von Oxyäthyltheophyllin und *Lacarnol* (H. Ehrhart), haben uns veranlaßt, in tierexperimentellen Untersuchungen auch eine *dromotrope Wirkung der Xanthine* nachzuweisen.

Während Frank u. Mitarb. ihre Aufmerksamkeit vor allem auf *synergistische Effekte* von Oxyäthyltheophyllin und *Lacarnol* richteten, ist uns beim Studium der Wechselbeziehungen von *Lacarnol*-Theophyllin *ein Antagonismus* aufgefallen, der für einen direkten Angriffspunkt der Methyl-Xanthine am Reizleitungssystem spricht. Erst neuerdings ist es Härtfelder u. Kuschinsky gelungen, die *inotrope* Wirkung des Theophyllin am Herzlungenpräparat der Katze darzustellen. Dieser Effekt ist aber lediglich am geschädigten Herzen nachzuweisen und daher nur mit Einschränkung von der erregungsleitungsfördernden Wirkung zu trennen.

1. Untersuchungen am isolierten Meerschweinchenherz nach Langendorff. Die ersten Beobachtungen eines „*Methylxanthin-Adenosin-Antagonismus*" wurden von uns am isolierten Meerschweinchenherzen (Methode nach Langendorff) gemacht. Bekanntlich tritt nach Verabfolgung geringer Adenosin-Dosen (besonders bei Meerschweinchen) ein Herzstillstand auf (Drury u. Szent-Györgyi). Wir fanden in der Regel, daß

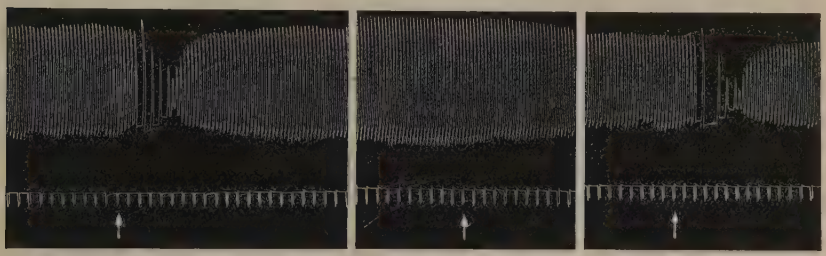
[1] Lacarnol = auf bestimmten Adenosingehalt standardisierter Organextrakt, 1 cm³ wirkungsgleich 2 mg Adenosin.

[2] Zusammensetzung:

7-Oxyäthyltheophyllin . . .	0,22	Lacarnol-Lsg. pro inject. . . .	1,0 cm³
Adenosin	0,002	Gentisin-Natrium	0,1
		Aqua bidest.	ad 2,0

nach Applikation von *Parmanil* der auf Grund seines Adenosingehaltes erwartete Herzstillstand nicht auftritt oder weitgehend unterdrückt ist.

Die Aufhebung einer Adenosin-Nebenwirkung durch Oxyäthyltheophyllin wurde nicht nur beobachtet, wenn Adenosin gleichzeitig mit Oxyäthyltheophyllin verabfolgt wurde, sondern auch dann, wenn Adenosin bis zu 3 min nach Oxyäthyltheophyllin gegeben wurde. Am Meerschweinchenherzen wurden in der Regel 5—20 γ Adenosin durch 250 γ bis 1 mg Oxyäthyltheophyllin antagonistisch beeinflußt. Dieses



a b c

Abb. 1. Isoliertes Meerschweinchenherz nach LANGENDORFF. a A-V-Block nach Verabfolgung von 5 γ Adenosin, b nach 4 min Gabe eines Gemisches von 5 γ Adenosin und 250 γ Theophyllin: Auslöschung des Adenosin-Effektes. c Nach weiteren 4 min Rückkehr des A-V-Blockes nach 5 γ Adenosin. Zeit in Sekunden

Verhältnis der Dosen liegt auch in *Parmanil* vor. Grundsätzlich ähnliche Versuchsergebnisse erhält man auch mit anderen Methylxanthinderivaten, z. B. mit Theophyllin (Abb. 1).

2. Untersuchungen am narkotisierten Meerschweinchen. Da wir diesen Antagonismus auch am Ganztier näher verfolgen wollten, haben wir weitere Untersuchungen an etwa 300 g schweren Meerschweinchen in Urethan-Narkose (25%ige Urethan-Lösung, 4 cm³/kg i.p.) durchgeführt. Die Vena jugularis wurde freipräpariert, eine Kanüle eingebunden und die Herztätigkeit im EKG bzw. in einem Kardioskop, das den QRS-Komplex des EKGs verstärkt wiedergibt, registriert. Wird Adenosin in die Vena jugularis injiziert, so kommt es auch am lebenden Tier zu dem von DRURY u. SZENT-GYÖRGYI erstmalig beobachteten Adenosin-Effekt (Atrioventrikulärer Block).

Wird eine bestimmte Adenosinmenge in 0,5 cm³ physiologischer NaCl-Lösung i.v. injiziert, so tritt nach einer Latenzzeit von etwa 10 sec ein abrupt einsetzender A-V-Block auf, der in Abhängigkeit vom Adenosingehalt der Lösung von verschiedener Dauer ist (siehe Tab. 1). Die Schlagfolge normalisiert sich wieder über einen 2:1- oder 3:1-Block innerhalb weniger Sekunden. Die Vorhoftätigkeit bleibt anfangs normal, später tritt häufig eine unregelmäßige Vorhoftätigkeit ein, mitunter kann auch Vorhofflattern beobachtet werden. Nach wieder einsetzender Kammertätigkeit erweist sich die Überleitungszeit mitunter verlängert, gelegentlich auch

verkürzt. Die Dauer des A-V-Blocks kann mit einer Stoppuhr genau gemessen werden (Tab. 1). Mit ein und derselben Adenosin-Dosis läßt sich aber nur dann ein gleichlang andauernder Block erzeugen, wenn die *Injektionen in kurzen Zeitabständen* und mit gleichmäßiger Geschwindigkeit erfolgen.

Ähnlich wie am isolierten Herzpräparat läßt sich auch am Ganztier der antagonistische Einfluß der Methyl-Xanthine auf den Adenosin-Herzblock des Meerschweinchens nachweisen (s. Tab. 1). Als Beispiel dient hier die i.v. Injektion von 14 mg 7-Oxyäthyltheophyllin pro Tier. Durch dieses wird ein A-V-Block (nach 140 γ Adenosin) von 11,1 sec auf 4,1 sec herabgesetzt. Der Vergleich verschiedener Methyl-Xanthine miteinander zeigt, daß Coffein, Theophyllin und Oxyäthyltheophyllin — besonders in Grenzdosen — nur quantitativ hinsichtlich des Adenosin-Antagonismus verschieden sind. So entspricht eine 0,044 molare Lösung von 7-Oxyäthyltheophyllin einer 0,011 molaren Coffein- bzw. einer 0,005 molaren Theophyllinlösung.

Tabelle 1. *Beispiel: Versuch vom 15. 5. 1957, Meerschweinchen 350 g*

Adenosin γ/0,5 cm³	A-V-Block (sec)	
	vor Injektion	nach Injektion von 7-Oxyaethyltheophyllin 14 mg
40	2,2	kein Block
60	4,0	kein Block
80	5,7	kein Block
100	7,4	kein Block
120	9,3	kein Block
140	11,1	4,1

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die Frage über die Entstehung des Adenosinblocks wird noch immer in der Literatur diskutiert. Wir schließen uns der Ansicht an, daß dieser Effekt, der nicht nur durch Adenosin hervorgerufen wird, sondern auch anderen Adenosinderivaten, z. B. dem ATP zukommt, *primär nichts mit einer den Actomyosinkomplex des Herzmuskels aktivierenden Wirkung zu tun hat, sondern daß es sich um eine pharmakodynamische Wirkung des Adenosin auf die reizleitenden Elemente des Herzens handelt* (Fischer u. Fröhlicher); *dementsprechend ist auch eine antagonistische Wirkung der Xanthine auf die Adenosinblockbildung als dromotrope Wirkung zu deuten.* Dosen, die am Meerschweinchen bereits den Adenosinblock wesentlich beeinflussen, z. B. 1—2 mg/kg Theophyllin, sind mit anderen Methoden bisher am *Ganztier* nicht nachweisbar gewesen. Auch die nur scheinbar geringeren Dosen, die Straub u. Mitarb. zum Nachweis von Methyl-Xanthinderivaten am isolierten Frosch-Gastrocnemius benützen, liegen — bezogen auf Kilogramm — in einer Größenordnung, die ein Vielfaches der von uns gebrauchten Dosen beträgt. Auch scheint ein spezifischer Antagonismus vorzuliegen.

Untersuchungen mit anderen auf das Reizleitungssystem wirksamen Substanzen zeigten, daß diese in den von uns angewandten Dosen ohne Einfluß

auf den Adenosinblock sind. Chinidin, Procainamid, Veratrin, Bariumchlorid, Natriumcitrat, Natriumoxalat bleiben wirkungslos. Lediglich stark wirksame Oberflächenanaesthetica vermögen in toxischen Dosen, wenn bereits schwerste Funktionsstörungen im EKG zur Beobachtung kommen, das ausgeprägte Bild des Adenosinblocks zu verwischen. Madinaveitia u. Raventos konnten mit einer Reihe von Antimalariamitteln in höheren Dosen einen Antagonismus gegen Adenosin feststellen. Wir fanden bisher auch umgekehrt keine Substanz, die den Adenosinblock verlängert.

Durchtrennung der Nervi vagi beiderseits und Atropinisierung verhindern nicht die Bildung des A-V-Blocks durch Adenosin. Daß der Adenosin-Xanthineffekt keine Muskelwirkung darstellt, sondern das Reizleitungssystem betrifft, machten Versuche am isolierten Froschmuskel wahrscheinlich. Eine durch Grenzkonzentrationen hervorgerufene Xanthinkontraktur am isolierten Musc. rectus oder Musc. sartorius weiblicher Esculenten ließ sich weder durch Adenosinvorbehandlung noch durch gleichzeitige Behandlung mit äquimolaren Adenosindosen unterdrücken. Auch die Messung der Durchströmung am Langendorff-Herz (Meerschweinchen) ergibt, daß die Coronargefäß-erweiternde Wirkung der beiden Substanzen erhalten bleibt. Eine chemische Bindung der Methyl-Xanthine durch Adenosin scheint nicht vorzuliegen. Untersuchungen über eine etwaige Komplexbildung zwischen Adenosin und Coffein bzw. Theophyllin oder Oxyäthyltheophyllin verliefen negativ. Ob es sich bei diesem Antagonismus um eine „competitive inhibition" handelt, sei dahingestellt, ebenso wie die Frage, ob die pharmakologische Wirkung der Methyl-Xanthinderivate ganz allgemein als Adenosinantagonismus zu deuten ist. In jedem Falle entspricht der beschriebene Effekt des Gemisches der klinischen Forderung, daß Coronargefäß-erweiternde Medikamente das Reizleitungssystem nicht beeinflussen sollen.

Zusammenfassung

Adenosin und Xanthin-Derivate beeinflussen sich nicht nur synergistisch, wie Frank u. Mitarb. zeigen konnten, sondern auch antagonistisch. So haben wir am atrioventrikulären (A-V.)-Block des Meerschweinchenherzens nach Adenosin folgendes feststellen können:

1. Der A-V.-Block nach Adenosingabe kann am isolierten Meerschweinchenherzen nach Langendorff sowie am Ganztier durch vorherige Injektion von Methyl-Xanthinderivaten (Coffein, Theophyllin oder 7-Oxyäthyltheophyllin) unterdrückt werden.

2. Der Methyl-Xanthin-Adenosin-Antagonismus spielt sich im Reizleitungssystem ab; die Methyl-Xanthinabkömmlinge besitzen demnach u. a. eine dromotrope Wirkung.

3. Der Antagonismus beruht nicht auf einer chemischen Komplexbildung, was durch chemische Untersuchungen und Versuche am isolierten Froschmuskel ausgeschlossen werden kann.

4. Mit Hilfe der Verkürzung des Adenosinblockes lassen sich auch am lebenden Tier noch kleinste Dosen von Methyl-Xanthinderivaten nachweisen.

Literatur

Drury, A. N., and A. Szent-Györgyi: The influence upon the heart of a substance present in heart muscle and other tissues. Proc. Physiol. Soc. (J. Physiol.) (London) **67**, 14 (1929). — The influence upon the heart of substances related to nucleic acid. Proc. Physiol. Soc. (J. Physiol.) (London) **67**, 35 (1929). — The physiological activity of adenin compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J. Physiol. (London) **68**, 213 (1929/30). — Ehrhart, H.: Persönliche Mitteilung. — Fischer, H., u. R. Fröhlicher: Wiederherstellung des normalen Herzschlages nach elektrisch erzeugtem Kammerflimmern durch Adenosintriphosphorsäure. Experentia (Basel) **4**, Nr. 4 (1948). — Frank, A., H. J. Bretschneider, E. Kanzow u. U. Bernard: Über die Wirkung von Lacarnol, Oxyäthyltheophyllin, Dioxypropyltheophyllin und von Kombinationen dieser Stoffe auf Coronardurchblutung und Herzstoffwechsel. Z. exper. Med. **128**, 520 (1957). — Härtfelder, G., u. G. Kuschinsky: Theophyllin-Wirkungen am Herz-lungenpräparat der Katze. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **230**, 386 (1957). — Madinaveitia, J., and J. Raventos: Antimalaria compounds as antagonists of adenosine. Brit. J. Pharmacol. **4**, 81 (1949). — Straub, W., u. D. N. Kesarbani: Eine Methode zur biologischen Auswertung von Coffein. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 457 (1941).

Prof. Dr. L. Ther, Frankfurt a. M., Pharmakologisches Laboratorium d. Farbwerke Hoechst A.-G.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 591—592 (1957)

Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät der Karlsuniversität, Pilsen, ČSR
(Vorstand: Dozent Dr. Adolf Zelený)

Über den Einfluß von Chlorpromazin auf den Acetylcholingehalt des Herzens

Von
Jaroslav Vlk*

(Eingegangen am 29. Juli 1957)

In einer vorangehenden Arbeit (Vlk, Lukač 1957) befaßten wir uns mit dem Einfluß des Chlorpromazins auf die Tätigkeit des isolierten Herzens von Kaltblütern und Säugetieren. Wir haben unter anderem festgestellt, daß Chlorpromazin die inhibitorische Wirkung des Vagus und des Acetylcholins aufhebt; in manchen Fällen wirkte Acetylcholin nach der Applikation von Chlorpromazin sogar positiv inotrop. Es erschien interessant, den Einfluß des Chlorpromazins auf den Acetylcholingehalt der einzelnen Teile des Herzens festzustellen.

Zu den Versuchen verwendeten wir weiße Ratten (Männchen) mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g. Chlorpromazin wurde intraperitoneal in Dosen von 20 mg/kg Körpergewicht 2 Std vor der Tötung des Tieres appliziert. Die Kontroll- sowie Versuchstiere wurden durch Dekapitation getötet. Bei der Präparation des Herzens, zur Extraktion des Acetylcholins und bei dessen quantitativer Bestimmung benutzten wir die von Rothschuh (1954) beschriebene Methode, mit dem Unterschied, daß wir als Testobjekt nicht den M. rectus abdominis des Frosches, sondern den Rückenmuskel des Blutegels verwendeten.

Ergebnisse

Die Resultate haben wir in der Tabelle gleichzeitig mit der statistischen Auswertung (Methode des *t*-Testes) zusammengefaßt. Was die Verteilung von Acetylcholin in den einzelnen Teilen des Herzens anbelangt, stimmen unsere Resultate prinzipiell mit denen von K. E. Rothschuh (1954) überein. Die größten Mengen enthalten die Herzvorhöfe, geringere die rechte Herzkammer, die geringsten Mengen sind in der linken Herzkammer enthalten. Der Gehalt an Acetylcholin ist daher umgekehrt proportional der Muskelmasse des untersuchten Herzteiles. *Chlorpromazin* steigert signifikant den Acetylcholingehalt in den Herzvorhöfen (durchschnittlich um 68%), nicht aber in den Herzkammern.

* Die statistische Auswertung wurde gefälligerweise von V. Lindaur, aus unserem Institut, durchgeführt.

Tabelle

Herzteil	Tier	M	N	σ	$\Sigma \Delta x^2$	t	p	Prozent der Änderung gegenüber der Norm
Vorhöfe	Kontrolle	3,74	6	± 0,40	0,8042			
	mit Chlorpromazin	6,23	6	± 0,83	4,1562	6,10	< 0,01	+68
Rechte Kammer	Kontrolle	1,63	6	± 0,50	1,2776			
	mit Chlorpromazin	2,05	6	± 0,79	3,1498	1,10	> 0,1	+28
Linke Kammer	Kontrolle	0,80	6	± 0,15	0,1213			
	mit Chlorpromazin	0,82	6	± 0,25	0,3178	0,09	> 0,9	+ 2,5

Bemerkungen

Courvoisier u. Mitarb. (1953) stellten fest, daß Chlorpromazin die Aktivität der plasmatischen Pseudocholinesterase inhibitiert. Sinigaglia (1955) konstatierte, daß Chlorpromazin in geringeren Konzentrationen die Aktivität der Cholinesterase im Gehirn stimuliert, in höheren Konzentrationen diese jedoch herabsetzt. Mintacol, das die Cholinesterase spezifisch inhibiert, ruft ähnliche Veränderungen im Acetylcholingehalt des Herzens hervor (Rothschuh 1955), wie Chlorpromazin in unseren Versuchen.

Unsere Befunde könnten deshalb ihre Erklärung in einer Hemmung der Cholinesterase des Herzens durch Chlorpromazin finden.

Zusammenfassung

Zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion von 20 mg/kg Chlorpromazin ist bei weißen Ratten der Acetylcholingehalt der Herzvorhöfe, nicht derjenige der Herzkammern, signifikant erhöht.

Literatur

Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky u. P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — Rothschuh, K. E.: Klin. Wschr. **1954**, 1. — Pflügers Arch. **258**, 406 (1954); **258**, 481 (1954); **260**, 374 (1955). — Sinigaglia, M. G.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 1628 (1955). — Vlk, J., u. V. Lukač: in Druck gegeben (1957).

Dr. J. Vlk, Physiolog. Institut der med. Fak. der Karlsuniv., Pilsen, ČSR, Lidická 1

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 593—595 (1957)

Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät der Karls-Universität Pilsen/ČSR
(Vorstand: Dozent Dr. Adolf Zelený)

Der Acetylcholingehalt des Gehirns nach Verabreichung von Chloropromazin

Von
A. Zelený, V. Lindaur und J. Kozák*

(Eingegangen am 5. März 1957)

Der Acetylcholingehalt im Gehirngewebe ändert sich bei verschiedenen funktionellen Zuständen des ZNS. Crossland u. Merick 1954 haben festgestellt, daß der Acetylcholingehalt in verschiedenen Teilen des Gehirns bei der Narkose erhöht ist, besonders dann, wenn diese tief ist. Zu ähnlichen Resultaten sind Hobiger u. Werner 1948 gekommen. Bei der Polarisation durch Gleichstrom ändert sich der Acetylcholingehalt im Gehirn (Raspopova, Vasiljev). Bei der Einwirkung von Wechselstrom auf Gehirnrindenschnitte fand Rowsell eine Acetylcholinzunahme.

Wir haben uns die Frage gestellt, ob der Acetylcholingehalt durch Chlorpromazin beeinflußt wird.

Methodik

Zu den Versuchen wurden 200 g schwere Ratten (Wistar) benutzt. Den Tieren wurde Chloropromazin in Dosen von 10—25 mg/kg intraperitoneal entweder chronisch an 5 aufeinanderfolgenden Tagen oder in einer einmaligen Gabe 1 Std vor der Tötung appliziert. Die Tiere wurden rasch dekapitiert, und die Köpfe sofort in eine Gefriermischung von CO_2-Eis in Äther (—76° C) eingetaucht. Nach 2 min wurde der Kopf herausgezogen und das Gehirn schnell herausgenommen, gewogen, dann in 2 ml 10%iger Trichloressigsäure homogenisiert, nach 1 stündiger Extraktion zentrifugiert und knapp vor der Titration neutralisiert auf p_H 6,5. Die Titration wurde am Musc. rect. abdominis durchgeführt. Die Empfindlichkeit des Muskels wurde durch Zugabe von Aceton erhöht (2% Aceton in Ringer-Lösung).

Versuchsergebnisse

Bei einem Vergleich zwischen gefrorenen und nicht gefrorenen Gehirnen geht hervor, daß keine signifikanten Unterschiede bestehen. Die Werte des Acetylcholins sind in μg/l Gramm Gewebe angegeben (Tab. 1).

Zu denselben Befunden kamen auch Herken u. Neubert 1953, die zum Gefrieren flüssigen Stickstoff benutzten. Dementgegen fanden

* Mit dankbarer Anerkennung der technischen Mitarbeit von N. Lang (techn. Assistent), J. Klausvicová (techn. Assistentin) und M. Bakalová (Sekretärin des Instituts) bei der Übersetzung der Arbeit.

Crossland u. a. wesentliche Unterschiede und empfehlen deshalb, das ganze Tier in flüssige Luft zu werfen.

In verschiedenen Funktionszuständen des Gehirnes wird auch der Acetylcholingehalt geändert, wie es aus der Arbeit von Richter u. Crossland hervorgeht. Auch Herken u. Neubert beobachteten bei verschiedenen Narkosen eine wesentliche Erhöhung des Acetylcholingehaltes im Gehirn der Ratten und weißen Mäuse.

Tabelle 1

	µg ACH/g	σ	Anzahl der Fälle	t	p
Ungefrorene Gehirne . . .	2,78	± 0,85	9	0,606	> 0,5
Gefrorene Gehirne	2,64	± 0,5	28		

Tabelle 2

	µg ACH/g	σ	Anzahl der Fälle	t	p
Kontrollen	2,78	± 0,85	9	0,742	< 0,5
Chloropromazin 10 mg/kg .	3,01	± 0,27	11		

Tabelle 3

	µg ACH/g	σ	Anzahl der Fälle	t	p
Kontrollen	2,64	0,5	28		
Chloropromazin 10 mg/kg .	3,24	0,53	10	2,92	< 0,01
Chloropromazin 25 mg/kg .	3,12	0,19	6	2,19	> 0,01

Tabelle 4

	µg ACH/g	σ	Anzahl der Fälle	t	p
Kontrollen (physiologische Lösung)	2,61	± 0,46	10	1,172	> 0,1
Tiere mit Chloropromazin (10 mg/kg) 2mal täglich während 5 Tagen . . .	2,83	± 0,41	10		

Tab. 2 zeigt den Acetylcholingehalt ungefrorener Gehirne ohne und mit Chlorpromazin (10 mg/kg Körpergewicht). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Tab. 3 zeigt den Acetylcholingehalt der Gehirne nach Gefrierung ohne und mit Chlorpromazin (10 mg und 25 mg/kg). Der Acetylcholingehalt der Gehirne der mit Chloropromazin behandelten Tiere ist statistisch wesentlich höher als bei den Kontrolltieren.

Wir haben untersucht, wie der Acetylcholingehalt durch wiederholte Verabreichung von Chlorpromazin beeinflußt wird. Den Tieren wurde an

5 aufeinanderfolgenden Tagen 2mal täglich 10 mg/kg Chloropromazin, den Kontrolltieren die entsprechende Menge 0,9% NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. 1 Std nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet, ihre Köpfe vereist und der Acetylcholingehalt bestimmt. Aus der Tab. 4 geht hervor, daß der Acetylcholingehalt im Gehirn bei dieser Versuchsanordnung nicht wesentlich geändert wird.

Besprechung

Signifikante Veränderungen des Acetylcholingehaltes im ganzen Gehirn haben wir nur nach *akuter* Verabreichung von Chloropromazin festgestellt, falls der Kopf des Tieres sofort nach der Tötung vereist wurde. Es ist bekannt (z. B. Bamdas), daß nach *chronischer* Verabreichung von Chloropromazin eine Adaptation des Organismus an dieses Präparat erfolgt. Vielleicht haben wir deshalb keine Veränderungen des Acetylcholingehaltes feststellen können. Die bei akuter Verabfolgung gefundene Steigerung des Acetylcholingehaltes im Gehirn kann schon deshalb nicht als ein direkter Eingriff des Chloropromazins in den Acetylcholinstoffwechsel aufgefaßt werden, weil es nicht gelungen ist, signifikante Aktivitätsveränderungen der Gehirncholinesterase nachzuweisen, worüber an anderer Stelle berichtet wird. Es ist eher anzunehmen, daß die zentrale Hemmung und Beruhigung des Tieres zu Änderungen des Acetylcholingehaltes im Gehirn führt, wie es z. B. Zuckermann u. Mitarb. bei verschiedenartig hervorgerufenen zentralen Hemmungen beobachteten.

Zusammenfassung

Es wurde der Acetylcholingehalt im Gehirn der Ratten nach Verabreichung von Chloropromazin in Dosen von 10 und 25 mg/kg K. G. untersucht und festgestellt, daß es zu einer signifikanten Steigerung nach akuter Verabreichung kommt, falls der Kopf des Tieres sofort nach der Dekapitation vereist wird. Es traten keine signifikanten Änderungen bei Tieren ohne Vereisung und bei wiederholter Applikation von Chloropromazin auf.

Literatur

Bamdas, B. S., G. D. Glod, L. J. Lando, A. P. Levkovič, G. K. Tarasov u. I. N. Chazen: Žur. nevropat. i psich. **56**, 121 (1956). — Crossland, J., and A. Merrick: J. of Physiol. **125**, 56 (1954). — Crossland, J., H. M. Pappius and K. A. C. Elliot: Amer. J. Physiol. **183**, 27 (1955). — Herken, H., u. D. Neubert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 223 (1953). — Hobbiger, F., and G. Werner: Arch. internat. Pharmakodynamie **76**, 229 (1948). — Raspopova, N. A.: Bjul. E. B. M. **11**, 80, 288 (1941). — Richter, D., and J. Crossland: Amer. J. Physiol. **159**, 247 (1949). — Rowsell, E. W.: Biochemic. J. **57**, 666 (1954). — Vasiljev, L. L.: Sb. instituta mozga, XV, 1941. — Zelený, A., J. Kozák u. N. Lang: I. Tagung der Neurologen in Bad Jeseník ČSR. 1956. — Zuckermann, E., H. Zimmel, A. Bufti u. A. Parteniu: Bul. stiintific Acad. R. P. R. Sect. med. **3** (1953). — Bul. Acad. R. P. R. Sect. med. VII **3**, 828 (1955).

Dozent Dr. A. Zelený, Pilsen/ČSR, Physiolog. Inst. d. medizin. Fakultät d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 231, S. 596—601 (1957)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle/Saale
(Direktor: Prof. Dr. med. et phil. F. Holtz)

Die Wirkung von Dihydrotachysterin (AT10) auf Hühner

Von
F. Holtz und **A. Tilgner-Peter**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juli 1957)

1932 stellten v. Brand, Holtz u. Putschar fest, daß die Empfindlichkeit verschiedener Säugetiere gegenüber Dihydrotachysterin sehr unterschiedlich ist. Nagetiere und Wiederkäuer sind z. B. relativ unempfindlich im Gegensatz zu Carnivoren. v. Brand u. Holtz konnten außerdem zeigen, daß Vögel in ähnlicher Weise auf entsprechende Dosen von Dihydrotachysterin reagieren wie Säugetiere. Ihre Untersuchungen an Kanarienvögeln ließen bei peroraler Verabfolgung von 20, 40 und 80 To.Gr./Tier Gewichtsabnahme und Verkalkungen in den Geweben erkennen. Wegen der geringen Größe dieser Vögel konnte der Blut-Calciumspiegel nicht bestimmt werden. Zur Erweiterung und Ergänzung dieser Untersuchungen führten wir vergleichende Versuche an Hühnern durch.

Material und Methodik

Für die Versuche wurden weiße Leghorn-Hähne (9 Tiere), infantile Hennen (8 Tiere), adulte nicht legende Hennen (5 Tiere) und Legehennen (6 Tiere) verwendet. Um die Einverleibung größerer Ölmengen zu vermeiden, wurde Antitetanin forte[1] verabreicht. Die peroral verabfolgten Dosen betrugen 5000 u. 10000 To.Gr./kg auf 10 Tage verteilt. Die Blutentnahme erfolgte aus der Axillarvene. Der Serum-Calcium-Gehalt wurde nach der Methode von Kramer-Tisdall, modifiziert nach F. Holtz, bestimmt (Fehlerbreite $\pm$ 0,3 mg-%). Da die Wirkung des Dihydrotachysterins weitgehend von dem Calcium- und Phosphatgehalt der Nahrung abhängig ist, erhielten sämtliche Versuchstiere folgendes Futtergemisch:

50 g Körner (Gerste/Weizen), 50 g Kartoffeln (gekocht), 12 g Fischmehl, 10 g Weizenkleie, 10 g Weizenschrot, 1 g Salzgemisch (ohne $CaCO_3$), 3 g $CaCO_3$, Wasser ad libitum.

Der Calcium- und Phosphatgehalt in der täglich von einem Huhn (Gewicht etwa 1,5 kg) aufgenommenen Futterration (durchschnittlich 50 g Körner und 50 g Weichfutter) betrug: Ca 1,6 g und P 0,8 g. Am Versuchsende sind die Hühner durch Entbluten getötet worden. Zur Feststellung der Organverkalkungen wurden Niere, Magen, Gefäße, Milz, Leber, Lunge und Herz in 96%igem Alkohol fixiert und die Organschnitte (Paraffineinbettung) nach Kossa gefärbt.

Zur exakten Beurteilung der Differenzen zwischen den Mittelwerten der Serum-Calciumgehalte verschiedener Versuchstage benutzten wir den t-Test (Pätau).

[1] Antitetanin forte (ölige Lösung von Dihydrotachysterin) besitzt eine 10fach höhere Konzentration als Antitetanin (Dresden). Antitetanin entspricht dem A.T.10.

Versuchsergebnisse

1. Die Wirkung von Dihydrotachysterin auf den Serumcalciumspiegel

Trotz gleicher Dosierung und gleichen Versuchsbedingungen bestehen bei Hühnern gegenüber Dihydrotachysterin geschlechts- und altersbedingte Unterschiede. Bei infantilen Hennen kam es unter Dihydrotachysterin nie zu einer signifikanten Zunahme der Serumkalkwerte und zum Gewichtsverlust ($P = 0{,}04$). Die Dosis von insgesamt 5000 To.Gr./kg hatte keinen Einfluß auf die normale Calcium-Konzentration im Blut (Abb. 1).

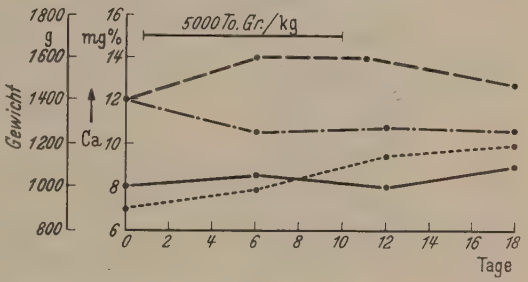


Abb. 1. Wirkung von Dihydrotachysterin auf infantile Hennen.
5 Kontrolltiere 5 Dihydrotachysterintiere
mg-% Ca
g Gew.

Vollkommen anders verhielten sich dagegen Hähne und adulte nicht legende Hennen gegenüber den gleichen Dihydrotachysterin-Gaben. Bei diesen Tieren kam es zu einer signifikanten Calcium-Erhöhung ($P < 0{,}0027$) und einer Gewichtsabnahme. Der Serumcalciumspiegel nicht legender Hennen war von 12,2 auf 15,7 mg-% gestiegen; der Ca-Gehalt im Serum der Hähne von 11,4 auf 15,4 mg-%. Eine Differenz ergab sich in der Höhe der prozentualen Gewichtsabnahme. Bei Hähnen war der mittlere Gewichtsverlust größer (10 — *24* — 39%) als bei nicht legenden Hennen (3 — *11* — 23%). Die Kontrolltiere zeigten im Gegensatz zu den Versuchstieren konstante Werte (Abb. 2 u. 3).

Die Reaktion legender Hennen auf Dihydrotachysterin-Gaben war sehr unterschiedlich. Während der Applikation kam es nur zu geringen Erhöhungen des Serumcalciumspiegels bei 3 Tieren (Tier 25, 26 u. 27). 1 bzw. 2 Tage nach dieser Periode zeigte ein Teil der Hühner (18, 22, 26 u. 27) sowohl nach 10000 als auch nach 5000 To.Gr./kg eine Senkung des Blutkalkspiegels um 3—4,5 mg-%. Im Gegensatz zu nicht legenden Hennen, bei denen eine eindeutige Erhöhung der Serumcalciumwerte festzustellen war, ließen legende Hennen zum Teil bei wesentlich höherer Dosierung eine Abnahme des Calcium-Gehaltes erkennen. Am Ende des Versuches (8 Tage nach der letzten Injektion) war bei einigen Tieren der Calcium-Gehalt wieder gestiegen (26 u. 27), bei Tier 18 noch mehr gefallen.

Als Erklärung für die unterschiedliche Reaktionsweise nicht legender und legender Hennen ist anzunehmen: Wie durch zahlreiche Untersucher bewiesen ist (Shimer, Laskowski, Correl u. Hughes, Benjamin

u. Hess u. a.), steigt der Serum-Calcium-Gehalt während der Legezeit an (von 12 auf 25 mg-%). Die für den Dihydrotachysterin-Versuch verwendeten legenden Hühner hatten demzufolge vor Versuchsbeginn einen erhöhten Serumkalkspiegel (16—21 mg-%). Während der Untersuchungszeit, abgesehen von den ersten 4 Tagen, stellten die Hühner

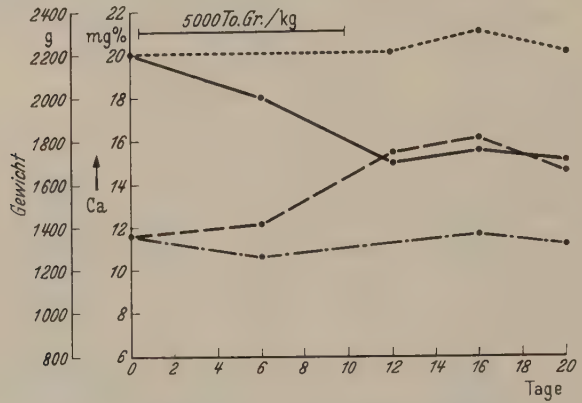


Abb. 2. Wirkung von Dihydrotachysterin auf Hähne
4 Kontrolltiere 5 Dihydrotachysterintiere
mg-% Ca
g Gew.

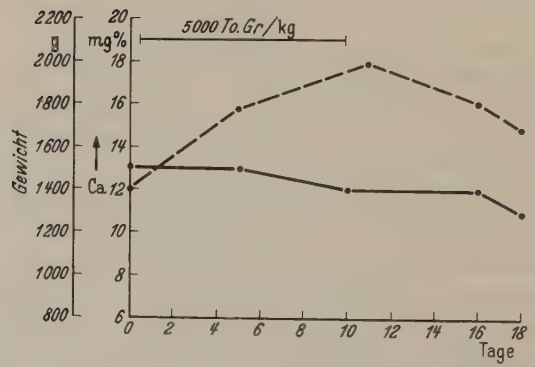


Abb. 3. Die Wirkung von Dihydrotachysterin auf den Serumcalciumspiegel und das Gewicht nicht legender adulter Hennen (5 Tiere). — — Ca mg-%; —— Durchschnittsgewicht in Gramm

das Eierlegen ein und der durch die Eiproduktion bedingte erhöhte Serumkalkspiegel fiel ab. Andererseits wurde Dihydrotachysterin verabfolgt, eine Substanz, die Calcium steigernde Eigenschaften besitzt. Es liefen also im Organismus zwei Vorgänge ab, die den Calcium-Stoffwechsel positiv und negativ beeinflußten. Welche Wirkung dabei überwiegt, ist auf Grund dieser Versuche fraglich; es kann angenommen werden, daß individuelle Schwankungen bei Tieren auftreten.

2. Organverkalkungen nach Dihydrotachysterin Tab. 1 ergibt die Stärke der Organverkalkungen unserer Versuchstiere nach Dihydrotachysterin-Vergiftung.

Wie von v. Brand, Holtz u. Putschar festgestellt wurde, ist die Niere das empfindlichste Organ. So wurde auch bei sämtlichen Hühnern, die Dosen von 5000—10000 To.Gr./kg erhielten, mit Ausnahme einiger

Tabelle 1. *Stärke der Verkalkungen nach Dihydrotachysterin in Niere, Magen und Lunge bei Hühnern*

Tierart	Nr.	Gesamt-Dosis in To.Gr./kg	Grad der Verkalkungen		
			Niere	Magen	Lunge
Hennen infantil	10	5000	–	–	–
	11		+++	–	–
	12		(+)	–	–
	13		–	–	–
	14		(+)	–	–
Hähne	6	5000	++	–	–
	7		+++	–	+
	8		++	–	(+)
	9		+	–	+
	10		++	++	(+)
Hennen nicht legend (adult)	2	5000	+	+	–
	3		++	(+)	–
	4		+	+	–
	5		+++	+	–
	6		+–++	+	–
Hennen legend	25	5000	++	++	+
	26		+	+++	+
	27		+++	++	+++
Hennen legend	18	10000	++	–	++
	21		++	–	+–++
	22		++	++	+
Kontrollen	7	–	–	–	–
	17		–	–	–

infantiler Hennen + bis +++ Nierenverkalkungen beobachtet. Außerdem traten Verkalkungen in Lunge und Magen auf. Die Verkalkungen des Magens betrafen das Bindegewebe zwischen den Drüsenschläuchen, teilweise die Muscularis mucosa und die Submucosa. Übereinstimmend mit den Befunden am Kanarienvogel (v. Brand u. Holtz) fanden wir keine Verkalkungen der Aorten. Kalkeinlagerungen in Milz und Leber wurden im Gegensatz zu den Ergebnissen am Kanarienvogel, aber übereinstimmend mit den Befunden an Säugetieren bei Hühnern niemals festgestellt. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die wesentlich

höhere Dosierung beim Kanarienvogel zurückzuführen. Die Umrechnung auf Kilogramm Körpergewicht ergaben Tagesdosen von 4210 To.Gr./kg (80 To.Gr./Tier), 2100 To.Gr./kg (40 To.Gr./Tier) und 1050 To.Gr./kg (20 To.Gr./Tier).

Vergleichende Betrachtungen über die Dihydrotachysterin-Wirkung bei Säugetieren und Vögeln

Vergleicht man die Ergebnisse über die Wirkung von Dihydrotachysterin bei Hühnern und Kanarienvögeln mit den Befunden, die v. Brand, Holtz u. Putschar für Säugetiere angeben, so ist zu bemerken: Bei Vögeln sind bei entsprechender Dosierung von Dihydrotachysterin die gleichen Effekte hervorzurufen (Calcium-Erhöhung, Organverkalkungen)

Tabelle 2. *Die Empfindlichkeit von Hühnern gegen Dihydrotachysterin gemessen am Anstieg des Serumcalciumspiegels, an der Gewichtskurve und den Organverkalkungen im Vergleich zu Mensch (Holtz, Gürsching und Kraut)*[1], *Hund*[2] *und Meerschweinchen*[3] *(v. Brand, Holtz und Putschar)*

	Mensch[1]	Hund[2]	Meerschw.[3]	Hahn	Henne adult nicht legend	Henne legend
Serumkalk in 8 Tagen Anstieg		Calcinosefaktor To.Gr./kg				
+ 2—3 mg-%			10000	5000		z.T. > 10000
+ 5—8 mg-%	180	100→200			5000	< 5000
Gewichtsverlust in 10 Tagen — 12,5%		150	4000	5000	5000	5000—10000
Verkalkungen ++—+++		150		5000	5000	5000—10000
Relative Empfindlichkeit		1	20	25	25	25

wie bei Säugetieren. Vögel zeigen im Gegensatz zu Säugetieren keine Kalkablagerungen in der Aorta. Die relative Empfindlichkeit, gemessen am Gewichtsverlust, Anstieg der Serum-Calcium-Werte und den Organverkalkungen entspricht ungefähr für Hähne, nicht legende sowie legende Hennen den Meerschweinchen. Hühner sind also relativ unempfindlich gegenüber Dihydrotachysterin. Vielleicht hängt dies mit der Unempfindlichkeit der Hühner gegen Ergocalciferol im Gegensatz zu Cholecalciferol zusammen. In Tab. 2 sind die Befunde für Hühner im Vergleich mit Mensch und Hund zusammengefaßt. Um bei infantilen Hennen die gleichen Effekte hervorzurufen, müssen noch höhere Dosen angewendet werden. Inwieweit auch bei Säugetieren altersbedingte Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Dihydrotachysterin bestehen, ist fraglich.

Beim Menschen nimmt der Bedarf an Dihydrotachysterin (Substitutionstherapie) im Alter (nach dem Klimakterium) ab. Gegen Parathormon sind infantile Säugetiere empfindlicher als adulte (F. Holtz).

Zusammenfassung

Die Untersuchungen über die Wirkung von Dihydrotachysterin bei Hühnern ergaben:

1. Abhängigkeit von Alter und Geschlecht.

a) Infantile Hennen sind im Gegensatz zu adulten Tieren gegenüber Dihydrotachysterin wesentlich unempfindlicher.

b) Hohe Dosen Dihydrotachysterin (5000—10000 To.Gr./kg) bewirken bei legenden Hennen Einstellung der Eiproduktion und damit Senkung des Serumcalciumspiegels.

2. Relative Unempfindlichkeit der Hühner, die ungefähr den Meerschweinchen entspricht.

3. Im Gegensatz zu Säugetieren treten niemals Verkalkungen der Aorten ein. Damit konnten die Untersuchungen am Kanarienvogel bestätigt werden.

Literatur

Benjamin, H. R., and A. F. Hess: J. of Biol. Chem. **103**, 451 (1933). — Brand, Th. v., F. Holtz u. W. Putschar: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 113 (1932). — Brand, Th. v., u. F. Holtz: Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. **37**, 535 (1933). — Correl, J. T., and J. S. Hughes: J. of Biol. Chem. **103**, 511 (1933). — Holtz, F., J. Gürsching u. H. Kraut: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **174**, 51 (1934). — Holtz, F.: Die Wirkstoffe der Nebenschilddrüse, in: Heffter-Heubner, Handb. exper. Pharm. 1937. — Laskowski, M.: Biochem. Z. **260**, 230 (1933). — Pätau, K.: Biol. Zbl. **63**, 152 (1943). — Shimer, S. R.: Univ. New Hamshire Tech. Bull. 69 (1937).

Prof. Dr. med. et phil. F. Holtz, Frankfurt/Main, Untermainkai 29III